

Docket No.: H6808.0056/P056  
(PATENT)

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of:  
Akihiro Sano et al.

Application No.: Not Yet Assigned

Confirmation No.: NYA

Filed: Concurrently Herewith

Art Unit: N/A

For: MASS SPECTROMETER SYSTEM

Examiner: Not Yet Assigned

**CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2003-207425	August 13, 2003

In support of this claim, a certified copy of the said original foreign application is filed herewith.

Dated: May 20, 2004

Respectfully submitted,

By 

Mark J. Thronson

Registration No.: 33,082

DICKSTEIN SHAPIRO MORIN &  
OSHINSKY LLP

2101 L Street NW

Washington, DC 20037-1526

(202) 785-9700

Attorney for Applicant

( Translation )

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of  
the following application as filed with this Office.

Date of Application: August 13, 2003

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 2003-207425

Applicant(s): HITACHI, LTD.  
Hitachi High-Technologies Corporation

May 12, 2004

Commissioner,  
Patent Office

Yasuo IMAI (seal)

Certificate No. 2004-3039293

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年    8 月 1 3 日  
Date of Application:

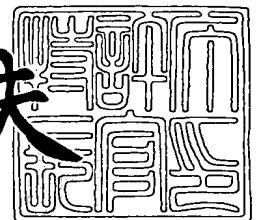
出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 2 0 7 4 2 5  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 2 0 7 4 2 5 ]

出      願      人  
Applicant(s):                      株式会社日立製作所  
   株式会社日立ハイテクノロジーズ

2 0 0 4 年    5 月 1 2 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号    出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 9 2 9 3

【書類名】 特許願

【整理番号】 1103012361

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 27/62

【発明の名称】 質量分析システム

【請求項の数】 38

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県日立市大みか町七丁目 1 番 1 号  
株式会社 日立製作所 日立研究所内

【氏名】 佐野 彰洋

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地  
株式会社 日立製作所 中央研究所内

【氏名】 平林 集

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地  
株式会社 日立ハイテクノロジーズ  
設計・製造統括本部 那珂事業所内

【氏名】 照井 康

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県日立市大みか町七丁目 1 番 1 号  
株式会社 日立製作所 日立研究所内

【氏名】 小林 金也

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県日立市大みか町七丁目 1 番 1 号  
株式会社 日立製作所 日立研究所内

【氏名】 ▲吉▼成 清美

## 【特許出願人】

【識別番号】 000005108

【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所

## 【特許出願人】

【識別番号】 501387839

【氏名又は名称】 株式会社 日立ハイテクノロジーズ

## 【代理人】

【識別番号】 100075096

【弁理士】

【氏名又は名称】 作田 康夫

【電話番号】 03-3212-1111

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013088

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 質量分析システム

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

質量分析装置の測定対象となる物質をイオン化し、生成した様々なイオン種の中から特定の質量対電荷比 $m/z$ を持つイオン種を選択して解離させ、更に、測定対象となるイオン種を選択と解離および測定を多段階繰り返すタンデム型質量分析装置を用いた質量分析システムにおいて、

$n-1$ 回のイオン種を選択・解離を行い、それに対し質量分析して得られた $n$ 段階目の質量分析結果である、イオンの質量対電荷比 $m/z$ に対する測定強度のピークで表された、マススペクトル測定結果に対し、予め指定されたイオン種の特性格データと一致する可能性の有無を判定し、その結果に基づき、 $MS^n$ の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定することを特徴とする質量分析システム。

【請求項 2】

請求項 1 において、予め指定されたイオン種の特性格データは、質量分析システムが内部で保有するデータベースに格納されることを特徴とする質量分析システム。

【請求項 3】

請求項 2 において、質量分析システムが内部で保有するデータベースは、一度測定されたイオン種の特性格データ、或いは、一度同定された蛋白質に対して、指定された酵素により分解・発生が予測される様々なペプチドに対する特性格データを自動格納することを特徴とする質量分析システム。

【請求項 4】

請求項 2 において、質量分析システムが内部で保有するデータベースは、ユーザが予め入力・指定した蛋白質に対して、指定された酵素により分解・発生が予測される様々なペプチドに対する特性格データを格納することを特徴とする質量分析システム。

【請求項 5】

請求項 1 において、予め指定されたイオン種の特性データと一致する可能性の有無を判定し、その結果に基づき、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定する方法において、 $n$  段階目の質量分析結果であるマススペクトルは、イオンの質量対電荷比  $m/z$  に対する測定強度のピークで表され、特性データと一致すると判定された、或る  $m/z$  値を持つイオンピークを、 $MS^n$  の次の分析のターゲットとする、或いは、ターゲットとならないように回避することを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 6】

請求項 1 において、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定する方法において、或る特定時間とは、 $n$  段階目のマススペクトル測定 ( $MS^n$ ) から次の分析測定を中断しない時間、または、 $n$  段階目のマススペクトル測定から次の分析へに移行時の準備時間、または 100 msec 以内、または 10 msec 以内のいずれかの時間であることを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 7】

請求項 1 において、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定する方法において、 $MS^n$  の次の分析内容とは、 $n$  段階目のマススペクトルのうち、或る  $m/z$  値を持つイオンピークの選択と  $n$  回目の解離および  $n+1$  段階目のマススペクトル質量分析測定することを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 8】

請求項 1 において、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定する方法において、 $MS^n$  の次の分析内容とは、 $n$  段階目のマススペクトル測定結果を得た際に、 $n-1$  段階目のマススペクトル ( $MS^{n-1}$ ) において選定した、或る  $m/z$  値を持つイオンピークとは異なる  $m/z$  値を持つイオンピークを、 $n-1$  段階目のマススペクトル測定結果から選定・解離し、再度  $n$  段階目のマススペクトル質量分析測定することを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 9】

請求項 8 において、 $n$  段階目のマススペクトル測定結果を得た際に、 $n-1$  段階目のマススペクトルにおいて選定した、或る  $m/z$  値を持つイオンピークとは異なる  $m/z$  値を持つイオンピークを、 $n-1$  段階目のマススペクトル測定結果

から選定・解離し、再度  $n$  段階目のマススペクトル質量分析測定する方法において、 $n$  段階目のマススペクトル測定結果を得た際に、 $n-1$  段階目のマススペクトルにおいて選定した、或る  $m/z$  値を持つイオンピークとは、質量数  $m$  が同じで価数  $z$  が異なるイオンピークを、 $n-1$  段階目のマススペクトル測定結果から選定・解離し、再度  $n$  段階目のマススペクトル質量分析測定することを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 10】

請求項 1 において、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定する方法において、 $MS^n$  の次の分析内容とは、それ以上の多段解離分析するタンデム質量分析には進まず、次の試料に対して、一段階目の質量分析、或いは、測定を終了することを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 11】

請求項 1 において、 $n$  とは、1 以上の整数値であることを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 12】

請求項 1 において、予め指定されたイオン種の特徴データとは、ペプチドの特性データとすることを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 13】

請求項 1 において、予め指定されたイオン種の特徴データとは、特定の蛋白質由来のペプチドの特性データとすることを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 14】

請求項 1 において、予め指定されたイオン種の特徴データとは、特定の糖鎖の特性データとすることを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 15】

請求項 1 において、予め指定されたイオン種の特徴データとは、特定の化学物質の特性データとすることを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 16】

請求項 1 において、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定することを特徴とする質量分析システムにおいて、ユーザが予め入力する項目とし



て、消化酵素や同位体ピーク判定の必要性の有無や内部データベースとの照合・検索の必要性の有無やイオン選定分解能などとすることを特徴とする質量分析システム。

【請求項 17】

質量分析装置の測定対象となる物質をイオン化し、生成した様々なイオン種の中から特定の質量対電荷比 $m/z$ を持つイオン種を選択して解離させ、更に、測定対象となるイオン種を選択と解離および測定を多段階繰り返すタンデム型質量分析装置を用いた質量分析システムにおいて、

$n-1$ 回のイオン種を選択・解離を行い、それに対し質量分析して得られた $n$ 段階目の質量分析結果である、イオンの質量対電荷比 $m/z$ に対する測定強度のピークで表された、マススペクトル測定結果に対し、同位体ピークを判定し、その結果に基づき、 $MS^n$ の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定することを特徴とする質量分析システム。

【請求項 18】

請求項 17において、 $n-1$ 回のイオン種を選択・解離を行い、それに対し質量分析して得られた $n$ 段階目のマススペクトル測定結果に対し、予め指定されたイオン種の特性データと一致する可能性の有無を判定する方法において、 $n$ 段階目のマススペクトル測定結果における、異なる $m/z$ 値を持つ各イオンピークに対し、同位体ピークを判定し、その結果に基づき、 $MS^n$ の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定することを特徴とする質量分析システム。

【請求項 19】

請求項 17または請求項 18において、同位体ピークを判定し、その結果に基づき、 $MS^n$ の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定する方法において、イオンピーク間隔が $1.1\text{ Da}$ 以下となるピークで、質量対電荷比 $m/z$ の大きい方のピークを同位体ピークと推定し、同位体ピークと推定されたピークとの間隔からイオン価数を導出し、各イオンピークの質量数 $m$ を算出し、その質量数 $m$ の値に基づいて、 $MS^n$ の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定する質量分析システム。

【請求項 20】

請求項 1 7 から請求項 1 9 のいずれかにおいて、同位体ピークを判定し、その結果に基づき、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定する方法において、同位体ピークと推定されたピークが、推定算出された各イオンピークの質量数  $m$  から同位体ピークの強度分布を算出し、その算出した強度分布に一致、或いは、誤差 5 0 % 未満で一致しているかで同位体ピークか否かを或る特定時間内に自動的に判定する質量分析システム。

**【請求項 2 1】**

請求項 1 7 から請求項 1 9 のいずれかにおいて、同位体ピークを判定し、その結果に基づき、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定する方法において、予めイオンの質量数  $m$  に応じて、同位体ピークの強度分布を計算し、その結果である同位体ピークの分布パターンをメモリやデータベースなどの記憶媒体で記憶しておき、推定算出された各イオンピークの質量数  $m$  に対する同位体ピークの分布パターンが、推定同位体ピークの分布パターンと一致、或いは、誤差 5 0 % 未満で一致しているかで同位体ピークか否かを或る特定時間内に自動的に判定する質量分析システム。

**【請求項 2 2】**

請求項 1 7 から請求項 1 9 のいずれかにおいて、同位体ピークを判定し、その結果に基づき、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定するシステムにおいて、更に、各イオンピークに対する価数  $z$ 、及び、質量数  $m$ 、或いは、質量数から推定される元素構成分布等のデータを、表示部により、表示する、或いは、データファイルとして排出、或いは、内部データベースに格納することの特徴とする質量分析システム。

**【請求項 2 3】**

請求項 1 7 から請求項 1 9 のいずれかにおいて、同位体ピークを判定し、その結果に基づき、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定する方法において、 $MS^n$  の次の分析のターゲットとするイオンピークの選定の際、同位体ピークを選択回避する、或いは、同位体を含まないピークを選択することの特徴とする質量分析システム。

**【請求項 2 4】**

請求項 17 から請求項 19 のいずれかにおいて、同位体ピークを判定し、その結果に基づき、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定する方法において、 $MS^n$  の次の分析のターゲットとするイオンピークの選定の際、同位体ピークも含めて、選択することを特徴とする質量分析システム。

【請求項 25】

請求項 21 において、予めイオンの質量数  $m$  に応じて、同位体ピークの強度分布を計算し、その結果である同位体ピークの分布パターンをメモリやデータベースなどの記憶媒体で記憶しておき、推定算出された各イオンピークの質量数  $m$  に対する同位体ピークの分布パターンが、推定同位体ピークの分布パターンと一致、或いは、誤差 50% 未満で一致しているかで同位体ピークか否かを或る特定時間内に自動的に判定する方法において、非常に近い質量対電荷比  $m/z$  値を持ち、質量数  $m$  や価数  $z$  が異なる複数のイオン種に対して、各々の質量数  $m$  に応じて、予め同位体ピークの強度分布を計算し、その結果である同位体ピークの分布パターンをメモリやデータベースなどの記憶媒体で記憶して、 $n$  段階目のマススペクトル測定結果におけるピークの分布パターンと一致、或いは、誤差 50% 未満で一致しているかで、複数イオン種が混在するピークか否かを或る特定時間内に自動的に判定することを特徴とする質量分析システム。

【請求項 26】

請求項 25 において、非常に近い質量対電荷比  $m/z$  値を持ち、質量数  $m$  や価数  $z$  が異なる複数のイオン種に対して、各々の質量数  $m$  に応じて、予め同位体ピークの強度分布を計算し、その結果である同位体ピークの分布パターンをメモリやデータベースなどの記憶媒体で記憶して、 $n$  段階目のマススペクトル測定結果におけるピークの分布パターンと一致、或いは、誤差 50% 未満で一致しているかで、複数イオン種が混在するピークか否かを或る特定時間内に自動的に判定するシステムにおいて、複数のイオン種が混在すると判定されたピークを、 $MS^n$  の次の分析のターゲットとして、選択回避する、或いは、選択することを特徴とする質量分析システム。

【請求項 27】

請求項 26 において、複数のイオン種が混在すると判定されたピークを、 $MS^n$

の次の分析のターゲットとして選択するシステムにおいて、複数のイオン種の混在の可能性を表示し、複数のイオン種の混在を判定した際に得られた情報である、複数のイオン種の質量数 $m$ や価数 $z$ を、 $MS^n$ の次の分析の結果得られたデータ解析に用いることを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 28】

請求項 1 において、予め指定されたイオン種の特徴データとは、質量分析の前処理の段階で、同位体でラベル化された試料と同位体ラベル化されない試料が混合された場合、同位体でラベル化された試料由来のイオンの特徴データとすることを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 29】

請求項 1 において、 $n-1$ 回のイオン種を選択・解離を行い、それに対し質量分析して得られた $n$ 段階目のマススペクトル測定結果に対し、予め指定されたイオン種の特徴データと一致する可能性の有無を判定する方法において、予め指定されたイオン種の質量数 $m$ 、及び、想定範囲内の価数から算出される質量対電荷比 $m/z$ 値に基づき、 $n$ 段階目のマススペクトル測定結果における、各イオンピークの $m/z$ 値に対し、一致するか否かを判定することを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 30】

請求項 1 から請求項 17 のいずれかにおいて、 $MS^n$ の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定する方法において、 $n$ 段階目の質量分析結果における各イオンピークにおいて、計測時間毎に強度が 50% 以上変化するピークは、 $MS^n$ の次の分析のターゲットとする、或いは、ターゲットとならないように回避することを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 31】

請求項 1 から請求項 17 のいずれかにおいて、測定対象となるイオン種を選択と解離および測定を多段階繰り返すタンデム型質量分析装置を用いた質量分析システムにおいて、質量分析装置として、イオントラップ型質量分析装置であることを特徴とする質量分析システム。

#### 【請求項 32】

請求項 1 から請求項 17 のいずれかにおいて、測定対象となるイオン種を選択と解離および測定を多段階繰り返すタンデム型質量分析装置を用いた質量分析システムにおいて、質量分析装置として、イオントラップー飛行時間型質量分析装置であることを特徴とする質量分析システム。

【請求項 33】

請求項 1 から請求項 17 のいずれかにおいて、測定対象となるイオン種を選択と解離および測定を多段階繰り返すタンデム型質量分析装置を用いた質量分析システムにおいて、質量分析装置として、リニアトラップー飛行時間型質量分析装置であることを特徴とする質量分析システム。

【請求項 34】

請求項 1 から請求項 17 のいずれかにおいて、測定対象となるイオン種を選択と解離および測定を多段階繰り返すタンデム型質量分析装置を用いた質量分析システムにおいて、質量分析装置として、四重極ー飛行時間型質量分析装置であることを特徴とする質量分析システム。

【請求項 35】

請求項 1 から請求項 17 のいずれかにおいて、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定処理する質量分析システムにおける計算処理に対し、必要なデータの格納に、キャッシュメモリや、ハードディスクを利用することを特徴とする質量分析システム。

【請求項 36】

請求項 1 から請求項 17 のいずれかにおいて、 $MS^n$  の次の分析内容を或る特定時間内に自動的に判定処理する質量分析システムにおける計算処理に対し、並列計算機を利用することを特徴とする質量分析システム。

【請求項 37】

請求項 1 から請求項 17 のいずれかにおいて、測定対象となるイオン種を選択と解離および測定を多段階繰り返すタンデム型質量分析装置を用いた質量分析システムにおいて、イオン種の解離方法として、衝突誘起解離、或いは、電子捕獲解離を採用することを特徴とする質量分析システム。

【請求項 38】

請求項 1 から請求項 17 のいずれかにおいて、測定対象となるイオン種の選択と解離および測定を多段階繰り返すタンデム型質量分析装置を用いた質量分析システムにおいて、 $n$  段階目の質量分析結果における各イオンピークにおいて、最大強度を持つピークに対し、最大強度に対する強度比が 70 % 未満であるイオンピークを、 $MS^n$  の次の分析のターゲットとする、或いは、ターゲットとならないように回避することを特徴とする質量分析システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、質量分析装置を用いた質量分析スペクトルの解析システムに係り、例えば、ポリペプチド、糖などの生体高分子の化学構造を高精度かつ効率的に同定するために、測定の実時間内で最適な質量分析フローを自動判定するシステムに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

一般的な質量分析法では、測定対象の試料をイオン化した後、生成された様々なイオンを質量分析装置に送り込み、イオンの質量数  $m$ 、価数  $z$  の比である質量対電荷比  $m/z$  毎に、イオン強度を測定する。この結果得られたマススペクトルは、各質量対電荷比  $m/z$  値に対する、測定されたイオン強度のピーク（イオンピーク）からなる。このように、試料をイオン化した、そのものを質量分析することを  $MS^1$  と呼ぶ。多段解離が可能なタンデム型質量分析装置では、 $MS^1$  で検出されたイオンピークのうち、ある特定の質量対電荷比  $m/z$  の値を有するイオンピークを選定して（選択したイオン種を親イオンと呼ぶ）、更に、そのイオンを、ガス分子との衝突等により解離分解し、生成した解離イオン種に対して、質量分析して、同様にマススペクトルが得られる。ここで、親イオンを  $n$  段解離して、その解離イオン種を質量分析することを  $MS^{n+1}$  と呼ぶ。このように、タンデム型質量分析装置では、親イオンを多段（1 段、2 段、 $\dots$ 、 $n$  段）に解離させ、各段階で生成したイオン種の質量数を分析する（ $MS^2$ 、 $MS^3$ 、 $\dots$ 、 $MS^{n+1}$ ）。

**【0003】**

(1) タンデム分析可能な質量分析装置のほとんどの場合、 $MS^2$  分析する際の親イオンを  $MS^1$  におけるイオンピークから選択する際、強度の高いイオンピークの順に、(例えば、強度の上位10位以内のイオンピークを) 親イオンとして選択して、解離、質量分析 ( $MS^2$ ) する、データディペンデント (Data Dependent) 機能を有する。

**【0004】**

(2) Finnigan社製のイオントラップ型質量分析装置では、 $MS^2$  分析する際の親イオンを  $MS^1$  におけるイオンピークから選択する際、ユーザが予め指定した質量対電荷比  $m/z$  値を持つイオン種を、親イオンとして選択回避する、ダイナミックエクスクルージョン (Dynamic Exclusion) 機能を備えている。

**【0005】**

(3) 測定されたイオン種と計測済みイオン種の一致度の判定に関する公知例としては、特開 2001-249114 号 (以下、特許文献 1 と呼ぶ)、特開平 10-142196 号 (以下、特許文献 2 と呼ぶ) が挙げられる。

**【0006】**

特許文献 1 では、1 段目のスペクトルデータ内の特徴的なピークとそれに対応するイオン種の 2 段目のスペクトルデータをデータベースに格納する。以後の測定において、前記データベース中の 2 段目のスペクトルデータに対して、測定対象試料の 2 段目の質量分析により得られたスペクトルデータと比較して、一致度を検証する。最も一致度の高いデータ成分を比較結果として出力する。

**【0007】**

特許文献 2 では、多段解離測定において、測定中に試料注入処理を挟まずに連続測定することで、 $MS^n$  と  $MS^{n+1}$  データ間の注入によるイオン強度変動を回避する。これにより、標準試料の添加が不要となり、効率的な定量分析が可能としている。 $MS^n$  と  $MS^{n+1}$  データ分析において、既に収集した指定イオンデータと一致するか否かにより、 $MS^{n+1}$  に戻るもしくは、次の  $MS^1$  測定を実施する。

**【0008】**

## 【特許文献 1】

特開 2001-249114 号公報

## 【特許文献 2】

特開平 10-142196 号公報

## 【0009】

## 【発明が解決しようとする課題】

(1) 「従来の技術」の (1) に示すデータディペンデント (Data Dependent) 機能では、多量に発現する蛋白質、或いは、蛋白質由来のペプチドを優先的にタンデム分析することになる為、既に同定された蛋白質やペプチドに対して、重複して計測する可能性が高い。これは、計測時間と試料の無駄につながる。これまでは、多量に発現する蛋白質中心に分析されてきたが、今後、病変蛋白質など微量な蛋白質の分析に移行してくると考えられる。データディペンデント (Data Dependent) 機能によると、微量な蛋白質を詳細にタンデム分析することは困難である。

## 【0010】

(2) 「従来の技術」の (2) に示すダイナミックイクスクルージョン (Dynamic Exclusion) 機能では、ユーザが予め指定した質量対電荷比  $m/z$  値を持つイオン種か否かを、質量対電荷比  $m/z$  値によって判定している為、質量対電荷比  $m/z$  値が同じでも、イオンの質量数  $m$  や価数  $z$  が異なるイオン種に対しても同様に、 $MS^2$  分析のターゲットから排除されてしまう可能性がある。

## 【0011】

これを回避する為には、予め指定したイオン種か否かを判定する際、各イオンピークの質量対電荷比  $m/z$  はマススペクトルから明らかであるが、質量対電荷比  $m/z$  値から判定するのではなく、各イオンピークの価数  $z$ 、質量数  $m$  から判定する必要がある。このとき、この各イオンピークの価数  $z$ 、質量数  $m$  を、測定中の実時間で算出することが必要となる。

## 【0012】

前記特許 1 及び 2 においては、 $MS^n$  データ分析には、データベース等との照合により、特定イオン種の同定を実施する。前記特許 1 及び 2 においても、デー



データベース上の登録値は、質量対電荷比 $m/z$ 値であり、必ずしも質量数 $m$ 自体が使用されていない、もしくは、1価イオン( $z=1$ )を前提としていた。また、MS分析から質量対電荷比 $m/z$ の測定値以外の情報(例えば、価数 $z$ 、質量数 $m$ の個別の特性データ)が使用されることはなく、必ずしも、効率的イオン選定のために適切な情報を使用していなかった。

#### 【0013】

(3) ペプチド鎖を構成するアミノ酸残基数を $K$ とし、アミノ酸の種類を20とすると、可能なアミノ酸配列の数は $K^{20}$ にもなる。これに、アミノ酸側鎖の化学修飾を考えると、その数は更に増大する。更に、アミノ酸残基数が増大すると、ペプチド鎖の同位体の数も増大する。特に、小さなペプチド鎖においては、同位体ピークの強度は小さいが、大きなペプチド鎖となると、同位体ピーク強度の方が増大する。同位体ピークを次の解離測定のプロイオン種と設定すると、最終的に行う蛋白質データベース検索・照合の精度が極端に低下して、大きなペプチドでは、データ処理が困難となる。

#### 【0014】

本発明の一つの目的は、質量分析装置によって生体高分子の化学構造を高精度かつ効率的に同定することにある。

#### 【0015】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明の一つの特徴によれば、主に以下の(1)～(5)の手段を採用し、ターゲットイオンを $n-1$ 回解離し、質量分析して得られたマススペクトル( $MS^n$ )を、測定の実時間内に高速解析し、次の分析内容を判定する。

(1) マススペクトル( $MS^n$ )における各イオンピークに対して、高速に同位体ピークか否かを判定する。

(2) 同位体ピーク判定された場合、同位体ピーク間の間隔 $1/z$ から、当該イオンピークの価数 $z$ 、イオンピークの質量数 $m$ を算出し、この質量数 $m$ に基づき、予め指定されたイオン種と一致するか否かを判定する。

(3) 質量分析装置の前段に液体クロマトグラフィー(LC)が設置されている場合、質量数 $m$ が同じであるが異なる構造を持つイオン種間を区別する為、LC

の保持時間（リテンションタイム）も、判定材料に用いる。

（４）測定を重複させない為、一度測定されたペプチドや、既に同定された蛋白質由来のペプチドの、質量数やリテンションタイムのデータを質量分析システム内蔵の内部データベースに格納し、マススペクトル（ $MS^n$ ）における各イオンピークに対して、一致するか否かを高速判定する。

（５）次の分析のターゲットを選定する際、同位体ピークを避ける。

#### 【0016】

本発明の上記特徴及びその他の特徴は、以下の記載でさらに詳細に説明される。

#### 【0017】

##### 【発明の実施の形態】

以下、図面を参照し、本発明の実施例について説明する。

#### 【0018】

まず、第一の実施例について説明する。図１は、本発明の第一の実施例である質量分析システムにおける分析内容を自動判定処理するフロー図である。質量分析データ１とは、図２に示す質量分析システム１９において計測されたデータである。質量分析装置１９では、分析対象の試料は、液体クロマトグラフィーなどの前処理系１１で前処理される。例えば、大元の試料であるタンパク質である場合、前処理系１１にて、消化酵素によりポリペプチドの大きさに分解され、液体クロマトグラフィー（ＬＣ）により分離・分画される。その後、イオン化部１２でイオン化され、質量分析部１３で、イオンの質量対電荷比 $m/z$ に応じて分離される。ここで、 $m$ はイオン質量、 $z$ はイオンの帯電価数である。分離されたイオンは、イオン検出部１４で検出され、データ処理部１５でデータ整理・処理され、その分析結果である質量分析データ１は表示部１６にて表示される。この一連の質量分析過程－試料のイオン化、試料イオンビームの質量分析部１３への輸送及び入射、質量分離過程、及び、イオン検出、データ処理の全体を制御部１７で制御している。

#### 【0019】

質量分析方法には、試料をイオン化してそのまま分析する方法（ＭＳ分析法）

と、特定の試料イオン（親イオン）を質量選択し、それを解離させて生成した解離イオンを質量分析するタンデム質量分析法がある。タンデム質量分析法には、解離イオンの中から、特定の質量対電荷比を持つイオン（前駆イオン）を選択し、更に、その前駆イオンを解離し、その際生成した解離イオンの質量分析を行うといったように、解離・質量分析を多段に行う（ $MS^n$ ）機能もある。つまり、大元である試料中の物質の質量分析分布をマススペクトルデータ（ $MS^1$ ）として計測後、ある  $m/z$  値を持つ親イオンを選択し、それを解離し、得られた解離イオンの質量分析データ（ $MS^2$ ）を計測後、 $MS^2$  データのうち、選択された前駆イオンを更に解離し、得られた解離イオンの質量分析データ（ $MS^3$ ）を計測するといったように、解離・質量分析を多段に行う（ $MS^n (n \geq 3)$ ）。各解離段階毎に、解離前の状態である前駆体イオンの分子構造情報が得られ、前駆体イオンの構造推定に非常に有効である。これら前駆体の構造情報が詳細になるほど、大元の構造である親イオン構造を推定する際の推定精度が向上する。

#### 【0020】

本実施例では、前駆イオンの解離方法として、まず、ヘリウムなどのバッファーガスと衝突させて解離させる衝突解離（Collision Induced Dissociation）法を採用した場合について言及する。衝突解離する為には、ヘリウムガスなどの中性ガスが必要となる為、図2に示すように、衝突解離するためのコリジョンセル（collision cell）13Aとして、質量分析部13とは別に設けている場合もあるが、質量分析部13に中性ガスを充満させて、質量分析部13内で衝突解離させてもよい。その場合、コリジョンセル13Aは不要になる。また、解離手段として、低エネルギーの電子を照射し、親イオンに多量に低エネルギー電子を捕獲させることにより、ターゲットイオンを解離させる電子捕獲解離（Electron Capture Dissociation）を採用しても良い。

#### 【0021】

図3に、従来手法による、タンデム質量分析のフローの自動判定法を示す。試料中の物質の質量分析分布である  $MS^1$  におけるスペクトルの中から、さらに、解離し、質量分析するターゲット（親イオン）を選択する際、従来は、強度の高いピークの順に選択され、 $MS^2$  以降の前駆イオン選択時でも、同様に、高い強

度のイオンピークが選択されてきた。このようなタンデム質量分析のフローの自動判定法では、例えば、試料がタンパク質の場合、多量に発現するタンパク質から酵素分解されたペプチドイオンが、タンデム質量分析のターゲットになりやすくなる。従って、多量に発現するタンパク質ばかりを、重複して分析する可能性が高くなる。

#### 【0022】

そこで、本発明では、予め指定したタンパク質を酵素分解した際に生成が予想される全ペプチドの質量数 $m$ や、LCのリテンションタイム（保持時間）が、計測された $MS^1$ の各イオンピークの値と一致するか否かを判定し、それに基づいて、計測中の実時間（例えば、30 msec 以内）で次のタンデム質量分析のターゲットとなる親イオンを自動判定する。例えば、多量に発現するタンパク質Aを既に計測・同定し、未計測の微量のタンパク質のみをタンデム質量分析したい場合、図6に示すように、同定済みタンパク質として、予め指定されたタンパク質Aのアミノ酸配列に対し、酵素消化によって切断されて生成されると予想されるペプチドを列挙する。この際、ユーザがユーザ入力部18にて予め入力した、前処理系11で使用した消化酵素の種類に基づいて、アミノ酸の切断の仕方を変更する。例えば、ユーザが前処理系11で消化酵素として、トリプシンを選択した場合、アミノ酸の切断の特徴として、切断されたペプチドのC末端にアルギニン（R）、或いは、リジン（K）のアミノ酸となる。例えば、タンパク質Aがミオグロビンの場合、酵素消化後、生成が予想される、C末端がR又はKとなるペプチドとして、23種が求められ、各ペプチドに対し、アミノ酸配列及び質量数を求めて、内部データベース10に格納する。図4に示すように、本実施例によれば、多量に発現するタンパク質を予め指定し、そのタンパク質由来のペプチドの特性データ（質量数やLCのリテンションタイム等）と計測マスペクトルデータとを比較し、内部データベース10に格納されたデータと一致していない、強度の低いイオンピークを次のタンデム質量分析のターゲットとして選択することができる。

#### 【0023】

ここで、ユーザ入力部18にて、ユーザは、消化酵素の種類その他、同位体ピー

ク判定必要性の有無や、内部データベースとの照合・検索の必要性の有無や、親イオン選定時の分解能などを予め入力することが出来る。

#### 【0024】

さらに、本実施例では、予め指定するイオン種の特徴データとして、質量対電荷比 $m/z$ ではなく、質量数を用いる。質量対電荷比 $m/z$ を照合するデータとして利用すると、 $m/z$ 値が一致し、イオン種の質量数 $m$ 、価数 $z$ が異なるイオン種も、タンデム質量分析のターゲットとしての選択を回避されてしまう。本実施例のように、質量数 $m$ を照合するデータとして利用すれば、 $m/z$ 値が一致し、イオン種の質量数 $m$ 、価数 $z$ が異なるイオン種も識別でき、より高精度にタンデム質量分析のターゲットの選択が可能となる。また、同じイオン種（質量数 $m$ が同じ）で、 $m$ 価数が異なり、 $m/z$ 値が異なる場合でも、同じイオン種として判定され、何度もタンデム質量分析のターゲットとして選択されることを回避することが出来る。

#### 【0025】

さらに、質量数 $m$ が同じで、異なるイオン種も存在することから、前処理11におけるLCのリテンションタイムのデータも、内部データベース10に格納し、利用しても良い。試料がLCカラムを通過する際、物質の化学的性質によりLCカラムへの吸着と脱着の平衡定数が異なるため、カラムから出てくる時間（リテンションタイム、或いは、保持時間）が異なる。この点を利用して、質量数 $m$ が同じで、異なるイオン種場合でも、化学構造や化学的性質が異なれば、LCのリテンションタイムも異なり、区別することが可能となる。従って、本実施例によると、質量数やLCのリテンションタイム等のよりイオン種を特定できるデータに基づいて、予め指定したイオン種か否かの判定をするため、タンデム質量分析したいターゲットのみの分析を高精度に実施でき、計測の無駄無く、ユーザが求める解析データを得ることが可能となる。

#### 【0026】

図7に内部データベース10に格納されたデータの例を示す。図7に示すように、一度計測されたペプチドに対しては、アミノ酸配列、質量数 $m$ 、LCの保持時間 $\tau$ 、一度同定されたタンパク質由来のペプチドに対しては、アミノ酸配列、

元のタンパク質名, 質量数 $m$ , LCの保持時間 $\tau$ , 一度計測された糖鎖に対しては、糖鎖名或いは糖鎖構造, 質量数 $m$ , LCの保持時間 $\tau$ , 一度計測された化学物質に対しては、化学物質名或いは構造, 質量数 $m$ , LCの保持時間 $\tau$ などがある。これらのデータは、計測後、自動的に内部データベース10に格納される。これらのデータの内部データベース10への格納処理は、測定の実時間内で実施するのが望ましいが、処理量が多い場合、例えば、タンパク質由来のペプチドの導出などが発生する場合、測定の実時間内で実施しなくても良い。

#### 【0027】

また、ここで、上記には、タンデム質量分析を回避したいイオン種のデータを予め指定していたが、タンデム質量分析を実施したいイオン種のデータを予め指定してもよい。

#### 【0028】

また、本発明の特徴である、予め指定したイオン種の特性データとして、イオン種の質量対電荷比 $m/z$ 値ではなく、イオン種の質量数 $m$ を参照する為には、得られた計測データを解析する必要がある。質量分析データ( $MS^n$ )1は、質量対電荷比 $m/z$ の値に対するイオン強度を表す為、得られる計測データは、質量対電荷比 $m/z$ である。この質量対電荷比 $m/z$ から、イオン種の質量数 $m$ を導出する方法として、本実施例では、図1に示すように、マススペクトルに対し、ピーク判定2を実施し、ピークと判定された $N_p$ 個のピークに対して、同位体ピーク判定3を実施する。図6に、同位体ピーク判定3の処理内容を示す。まず、ピークのスペクトルデータ( $x = m/z$ ,  $y = \text{強度}$ )に対して、同位体推定ピークの列挙3-1, 各イオンピークの価数, 質量数の算出3-2, 同位体ピーク強度分布算出及び最終同位体ピーク判定3-3の処理を実施する。同位体推定ピークの列挙3-1の内容としては、ピーク $i$ ( $x_i, y_i$ )とピーク $i+1$ ( $x_{i+1}(>x_i), y_{i+1}$ )間の間隔 $\Delta(m/z)_i = x_{i+1} - x_i$ が、 $\Delta(m/z)_i < 1.1$ となる場合、ピーク $i+1$ は、ピーク $i$ に対して、同位体1つを多く含む同位体ピークと推定し、 $\Delta(m/z)_i \geq 1.1$ となる場合は、ピーク $i+1$ は、ピーク $i$ に対して、同位体を含まないピークと判定する。同位体推定ピークの列挙3-1の例を図9に示す。 $P_{1-0}$ のピークに対して、各々 $\Delta m/z = 1.0$ ずつ離れた、

$P_{1-1}$ ,  $P_{1-2}$ ,  $P_{1-3}$  の3つのピークが同位体ピークと推定される。同様に、 $P_{2-0}$  のピークに対する同位体推定ピークは  $P_{2-1}$ ,  $P_{3-0}$  のピークに対する同位体推定ピークは  $P_{3-1}$ ,  $P_{3-2}$ ,  $P_{3-3}$  と推定される。次に、各イオンピークの価数、質量数の算出 3-2 について、図 10 を用いて説明する。試料がペプチドやタンパク質の場合は、構成元素は、C, O, N, H, S に限られる。自然存在比とペプチド内での包含数を考えると、炭素 C の同位体数が多くなる。 $C^{12}$  とその同位体である  $C^{13}$  との間の質量数差は、 $1.003354 \div 1.0$  [Da] である。従って、ピーク  $i+1$  は、ピーク  $i$  の同位体ピークと推定された場合、ピーク  $i$  ( $x_i$ ,  $y_i$ ) とピーク  $i+1$  ( $x_{i+1}(>x_i)$ ,  $y_{i+1}$ ) 間の、計測された間隔 ( $\Delta(m/z)_i = 1.0$  [Da] /  $z$ ) から、イオン種の価数  $z$  を求めることができる ((1) 式)。また、イオンが中性状態のときの質量数を  $m_p$  とすると、中性状態の質量数  $m_p$  にプロトンイオンの質量数分 (価数  $\times$  質量数  $m_H$ ) を加算した質量数となる ((2) 式)。

#### 【0029】

$$z = 1 / \Delta(m/z) \quad (1)$$

$$m/z = (m_p + z \times m_H) / z \quad (2)$$

従って、(1), (2) 式より、各イオンピークの価数、及び中性状態での質量数  $m_p$  を求めることが出来る。図 9 で用いた例では、図 10 に示すように、 $m/z = 500$  [Da] である  $P_{1-0}$  のイオンピークの価数  $z$  は 1、質量数  $m = 499$ ,  $m/z = 513$  である  $P_{2-0}$  のイオンピークの価数  $z$  は 1、質量数  $m = 512$  [Da],  $m/z = 520$  である  $P_{3-0}$  のイオンピークの価数  $z$  は 2、質量数  $m = 1038$  [Da] となる。次に、同位体ピーク強度分布算出及び最終同位体ピーク判定 3-3 の処理内容として、図 11, 図 12 を用いて説明する。例えば、試料が、タンパク質やペプチド等のアミノ酸配列の場合、アミノ酸の構成元素は、C, O, N, H, S に限られ、タンパク質データベース (Swiss Prot) から導出された 20 種の各アミノ酸の出現確率、及び、各アミノ酸の質量数を図 9A に示す。但し、アミノ酸の質量数は、ペプチド鎖状のアミノ酸 ( $-NH-CR-CO-$ ) の質量数である。ここで、R とは、アミノ酸種によって異なる残鎖のことである。これらのデータから、アミノ酸の平均質量数、及び、それを構

成する各構成元素数の平均値  $n_C$ ,  $n_O$ ,  $n_N$ ,  $n_H$ ,  $n_S$  が求まる。それらを、図 12 中の表 1 に示す。つまり、タンパク質やペプチドを表 1 に示した平均アミノ酸から構成されると仮定して、タンパク質やペプチドの質量数  $m$  から、 $C$ ,  $O$ ,  $N$ ,  $H$ ,  $S$  の構成元素数の概算数  $N_c$ ,  $N_o$ ,  $N_n$ ,  $N_h$ ,  $N_s$  が各々求まる。次に、同位体ピークの強度分布を導出する。表 2 に各同位体元素の存在比を示す。各同位体元素のうち、存在比が最も高いのは  $C^{13}$  である。そこで、同位体  $C^{13}$  のみを考慮する場合、包含される同位体数が  $N_{is}$  のときの同位体ピーク強度は次式で算出できる。

### 【0030】

$$P_{Nis} = [N_c C_{Nis} \cdot p_C(1)^{(N_c - N_{is})} \cdot p_C(2)^{N_{is}}] \times p_H(1)^{N_h} \cdot p_N(1)^{N_n} \cdot p_O(1)^{N_o} \cdot p_S(1)^{N_s} \quad (3)$$

ここで、 $p_C(1)$ ,  $p_C(2)$ ,  $p_H(1)$ ,  $p_N(1)$ ,  $p_O(1)$ ,  $p_S(1)$  は、表 2 中の存在比を表す。(3) 式を用いて、質量数に応じた同位体ピークの強度分布の算出例を図 18 に示す。このように、過程 3-2 により算出した質量数  $m$  から求めた同位体ピークの強度分布と、過程 3-1 において、推定された同位体ピークの強度分布との比較を行い、推定された同位体ピークの同位体無しピークに対する強度比が 50% 未満の誤差で一致する場合、推定同位体ピークを同位体ピークと最終判定し、推定された同位体ピークの同位体無しピークに対する強度比が 50% 以上異なる場合、その推定同位体ピークは同位体ピークと判定しない。図 9 で用いた例では、図 12 に示すように、同位体ピークの強度分布を考慮し、推定同位体ピークのうち、最終的に同位体ピークで無いと判定されたのは、 $m/z = 513$  である  $P_{2-0}$  と  $\Delta(m/z) = 1.0$  離れ、強度が  $P_{2-0}$  より高い、推定同位体ピーク  $P_{2-1}$  である。以上のような同位体ピーク判定処理 3 により、得られたデータである、各イオンピークの価数  $z$ , 中性状態の質量数  $m$ , 同位体ピークか否か、及び、包含された同位体数  $N_{is}$  の情報に対して、ファイル出力、或いは、表示部 16 にスペクトルを表示した際に、図 13 に示したように表示しても良い。以上のような情報は、ユーザにとって、タンデム質量分析のターゲットを決定する為、及び、測定終了後にスペクトルデータを解析する際には非常に有用な情報である。



## 【0031】

また、本実施例では、次のタンデム質量分析として、 $MS_n$ のイオンピークのうち、親イオンを選定して、さらにそれを解離・質量分析する $MS_{n+1}$ を採用する。ここで、親イオン対象候補の有無の判定5を実施し、親イオン対象候補がある場合は、 $MS_{n+1}$  分析内容決定7にて、次の $MS_{n+1}$  の親イオンを決定し、また、その親イオンが高効率に選択・解離出来るように、運転条件などを最適化変更しても良い。また、親イオン対象候補が無い場合は、次の試料分析 ( $MS^1$ ) や計測終了となる。

## 【0032】

さらに、本発明では、上記の処理を測定中の実時間内に高速処理する事の特徴とする。測定中の実時間内の例として、図14を用いて説明する。図14はタンデム質量分析 ( $MS^1$ ,  $MS^2$ ,  $MS^3$ ) する場合の装置の運転シーケンスを示す。 $MS^1$  から $MS^2$ ,  $MS^2$ から $MS^3$  に移行する際、次の分析への準備時間 $DT_p$  (約30 msec 以内) に、図1に示す一連の処理を実施する。このような高速処理のために、処理に必要なデータの格納のためにキャッシュメモリやハードディスクを確保し、必要であれば、並列計算機を用いても良い。

## 【0033】

このように、本実施例によれば、測定の実時間内に $MS_n$ のスペクトルを高速解析し、次のタンデム質量分析 $MS_{n+1}$  のターゲットか否かを実時間で高精度に判定し、図4に示すような、微量のイオンピークに対しても、タンデム質量分析が可能となる。

## 【0034】

次に、本発明の第二の実施例について図15を用いて説明する。ここでは、微量ペプチドのみの分析に限定し、実施例1にて実施する内部データベースとの照合処理4をする代わりに、単に、 $MS_n$  のスペクトルの各イオンピークに対し、最大強度のピークとの強度比を算出し、その強度比が、例えば、70%未満のピークを列挙し、次のタンデム質量分析 $MS_{n+1}$  のターゲットを実時間で判定する。但し、ここでも、同位体ピーク判定を実施し、該当するピークのうち、同位体ピークを、次のタンデム質量分析 $MS_{n+1}$  のターゲット対象から排除した方が望

ましい。ここで、最大強度のピークとの強度比として、ユーザが入力しても良い。この場合、内部データベースとの照合処理 4 を実施する必要が無い為、確実に測定の実時間内に、微量のイオンピーク判定が可能となり、微量のイオンピークに対しても、タンデム質量分析が可能となる。

#### 【0035】

次に、本発明の第三の実施例について図 5、図 16 を用いて説明する。ここでは、次のタンデム質量分析として、 $MS^{n+1}$  ではなく、再度  $MS^n$  をすることを特徴とする。つまり、 $MS^n$  のスペクトルを測定した際にターゲットにした親イオンとは異なる  $m/z$  値のイオンピークを  $MS^{n-1}$  のイオンピークから選択し、再度、 $MS^n$  を実施する。その概念図を図 5 に示す。 $MS^1$  において  $m/z = 1000$  ( $m=1000$ ,  $z=1$ ) のイオンピークを親イオンに選定し、 $MS^2$  分析を実施した結果、 $MS^2$  の解離スペクトルが少なく、アミノ酸配列を同定するには不十分と判定される場合など、 $MS^1$  においてターゲットの質量数が同じで価数が異なるイオンピークを ( $m/z = 500$  ( $m=1000$ ,  $z=2$ )) を親イオンに選定し、再度  $MS^2$  を実施する。この場合、親イオンの  $m/z$  が  $1/2$  になる為、親イオンを選択・解離する際、高効率に実施できるように、運転条件などを変更しても良い。このように、ターゲットの質量数が同じで価数が異なるイオンピークに対して、 $MS^2$  を繰り返すことにより、アミノ酸配列を同定するために、十分な数の解離ピークが得られることが多い。また、本実施例は、タンデム質量分析機能として、 $MS^2$  までの機能しかない装置にも適用可能である。

#### 【0036】

次に、本発明の第四の実施例について、図 17 を用いて説明する。ここでは、内部データベースとの照合処理 4 を行わずに、同位体ピークの判定を中心に実施することを特徴とする。ここで、同位体ピークでないと判定されたピークに対して、従来のように、強度の高い順に次のタンデム質量分析のターゲットを判定してもよい。図 18 に示すように、質量数が増加するにつれ、同位体ピークの方が高強度になる。従来のように、単に、強度の高いピークからタンデム質量分析すると、親イオンとして、同位体ピークを選定しかねない。その場合、同位体が含

まれている分、マススペクトルの $m/z$ がずれる為、データ解析した結果が、擬陽性の可能性が高くなる。本実施例によれば、同位体無しピークに対してのみ、強度の高い順に次のタンデム質量分析のターゲットに選定されるため、上記のような問題は回避される。

#### 【0037】

次に、本発明の第五の実施例について、図18、図19を用いて説明する。ここでは、図8に示した同位体ピーク判定処理3の代わりに、予め、図18に示すような、質量数に応じた同位体強度分布パターンを記憶しておき、実際の計測データとパターンマッチングすることにより、同位体ピークか否かを判定する。そのフロー図を図19に示す。本実施例によれば、実時間での同位体ピークの強度分布計算は実施せずに単なるマッチングで済むため、より確実に実時間での同位体判定処理が可能となる。

#### 【0038】

次に、本発明の第六の実施例について、図20を用いて説明する。これまでの実施例では、次のタンデム質量分析のターゲットイオンを選定する際に、同位体ピークを回避して選択したが、同位体ピークを含むように選定しても良い。このとき、親イオンの選定分解能を、同位体ピークの出現範囲に合わせて低下するように、分析条件を設定する。本実施例によれば、親イオンが元々微量で、さらに、同位体ピークの方が高強度の場合などに、同位体ピークを含めて、解離・質量分析できるため、解離ピークの強度を稼ぐことが可能となる。

#### 【0039】

次に、本発明の第七の実施例について、図21を用いて説明する。ここでは、 $m/z$ 値が同じ、或いは、非常に近い値で、質量数 $m$ 、価数 $z$ が共に異なるイオン種のピークが重なっている場合、同位体ピークの強度分布により、複数のイオン種の重なりを判定する。その実施例を図21に示す。イオン①は $m=1059.7$ 、 $z=1$ のイオン種であり、イオン②は $m=2119.5$ 、 $z=2$ のイオン種である。各々の場合の同位体無しピークと同位体ピークを示す。これらのイオンピークが同時に存在する場合、同位体無しのピーク位置で重なり、 $m/z=1060.7$ の位置で2種が混在してしまう。これを、タンデム質量分析すると、2種のイオン

の解離ピークが出現し、データ解析が非常に困難となる、或いは、データ解析した結果が間違ったアミノ酸配列を推定してしまう可能性がある。そこで、本実施例では、予め、複数のイオン種の  $m/z$  が一致する場合を推定して、それらの同位体ピークの強度分布を算出し、両者を重ね合わせた図 18 の 3 段目の分布を算出しておいて、記憶し、実施例五に示したように、それらの分布と計測したデータをパターンマッチング処理して、複数のイオン種が混在するかどうかを判定する。尚、複数のイオン種が混在する場合、そのイオンピークを次のタンデム質量分析のターゲットとして回避し、データ解析が困難な 2 種類のイオンの解離ピーク混在を防ぐ。また、複数のイオン種が混在する場合、そのイオンピークを次のタンデム質量分析のターゲットとして選択する場合、その可能性を表示し、ユーザに知らせる。また、複数のイオン種の混在を判定した際に得られた情報 ( $m$  や  $z$ ) をファイルなどに排出して、測定終了後のデータ解析に用いてもよい。

#### 【0040】

次に、本発明の第八の実施例について、図 22 を用いて説明する。ここでは、例えば、健常者と疾患者の発現タンパク質に対して、ICAT などの手法のように片方のタンパク質を同位体で標識し、比較する場合など、それらのタンパク質由来のペプチドを MS<sup>1</sup> 分析した際に、両者で強度比が発生した場合に、同位体標識した方、或いは、同位体標識しない方を、次のタンデム質量分析のターゲットに選択することを特徴とする。本実施例によれば、病変の可能性のあるタンパク質由来のペプチドを自動的に判定し、詳細に構造解析することが可能となる。

#### 【0041】

次に、本発明の第九の実施例について、図 23 を用いて説明する。ここでは、同位体ピーク判定を行わず、また、計測データにおける各ピークの  $m/z$  値の質量数  $m$  への変換を行わずに、内部データベース内の質量数  $m$  (例えば、 $m=2000$ ) に対して、単に想定範囲内の価数  $z$  (例えば、 $z=1\sim5$ ) で割った値  $m/z$  値に変換して、(例えば、 $m/z=2000, 1000, 666.7, 500, 400$ ) に基づいて、内部データベースとの照合を行う。この場合、非常に処理内容が軽くなる為、確実に計測の実時間内で処理が可能となる。

#### 【0042】

次に、本発明の第十の実施例について、図24を用いて説明する。ここでは、同じ試料に対して、時間を隔てて、複数回、質量分析した結果、図24に示すように、各々の計測スペクトルで、ほとんどのピークに対して強度分布傾向に違いが無い中、強度が50%以上も変動しているピークがある場合、そのような変動ピークをノイズピークと判定し、次のタンデム質量分析のターゲット対象から自動的に外すことを特徴とする。本実施例によれば、ノイズピークが偶発的に大きくなってしまった場合などに、そのようなノイズピークをタンデム分析してしまうことを回避できる。

#### 【0043】

次に、本発明の第十一の実施例について、図25を用いて説明する。ここでは、質量分析部として、イオントラップ型質量分析部を設置することを特徴とする。この場合、イオントラップ自身がコリジョンセルの役割を果たす為、コリジョンセルを別途設ける必要が無い。イオントラップは、タンデム分析 $MS^n$ が $n \geq 3$ で実施できる為、本発明のような、自動的に次のターゲットを判定するシステムは非常に有効である。

#### 【0044】

次に、本発明の第十二の実施例について、図26を用いて説明する。ここでは、質量分析部として、イオントラップー飛行時間型(TOF)質量分析部を設置することを特徴とする。この場合、イオントラップは、イオンの蓄積、親イオンの選択、及び、コリジョンセルとしての役割を示す。実際の質量分析は、TOF部にて高分解能分析される。本発明の内部データベースとの照合により、タンデム分析が必要と判定された場合は、イオントラップにて親イオンを選択・解離、TOFにて質量分析し、タンデム分析が必要と判定されない場合は、イオントラップを通過してTOFにて質量分析される。従って、本実施例によれば、タンデム分析の必要性を自動的に判定できる為、非常に高効率に分析が可能となる。

#### 【0045】

次に、本発明の第十三の実施例について、図27を用いて説明する。ここでは、質量分析部として、リニアトラップー飛行時間型(TOF)質量分析部を設置することを特徴とする。この場合、リニアトラップは、ポール状の四重極電極か

らなり、四重極電極間に中性ガスが充填され、イオンの蓄積、親イオンの選択、及び、コリジョンセルとしての役割を示す。実施例十二に比べて、イオンのトラップ率が大幅（約 8 倍）に向上する。従って、本実施例によれば、高感度データに基づいて、次の分析内容を決定する為、非常に高精度に、判定を実施することが可能となる。

#### 【0046】

次に、本発明の第十四の実施例について、図 25 を用いて説明する。ここでは、質量分析部として、四重極(Q ポール)－コリジョンセル－飛行時間型(TOF)質量分析部を設置することを特徴とする。本実施例の質量分析部では、基本的に  $MS^2$  までしか実施できない。しかし、一度の  $MS^2$  で解離ピーク数が不十分でも、本実施例によれば、親イオンを変えて（特に質量数が同じで価数が異なるピークに変えて）、 $MS^2$  を繰り返し実施でき、また、その必要性の判定を測定の実時間で実施できる為、本実施例の質量分析部で、従来不可能であった、更に解離して分析することが可能となる。

#### 【0047】

以上説明したように、上記実施例によれば、多段階解離して質量分析( $MS^n$ )する際、 $MS^n$  の各段階において、 $MS^n$  スペクトルに含まれる情報を有効に活用し、次の分析内容の判定、 $MS^{n+1}$  分析を実施する際の親イオンの選定などの分析フローの最適化を、測定の実時間内に、高効率、かつ、高精度に実施する自動判定するシステムであるため、計測の無駄なく、ユーザの欲するターゲットのタンデム質量分析が可能となる。

#### 【0048】

##### 【発明の効果】

本発明によれば、質量分析装置によって生体高分子の化学構造を高精度かつ効率的に同定することが可能となる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

本発明の第一実施例による質量分析フローの自動判定処理の流れの概略図である。

**【図 2】**

本発明の第一実施例による質量分析データを計測する質量分析システム全体の概略図である。

**【図 3】**

多段解離質量分析フローの一例である。

**【図 4】**

多段解離質量分析フローの一例である。

**【図 5】**

多段解離質量分析フローの一例である。

**【図 6】**

本発明の、内部データベース自動格納の処理内容の概略図である。

**【図 7】**

本発明の、内部データベース格納内容の概略図である。

**【図 8】**

本発明の、同位体ピーク判定処理内容の概略図である。

**【図 9】**

本発明の、同位体ピーク判定処理における、推定同位体列挙過程の概略図である。

**【図 10】**

本発明の、同位体ピーク判定処理における、価数、質量数の算出過程の概略図である。

**【図 11】**

生体内のアミノ酸 20 種の出現確率、及び、ペプチド鎖状での質量数を示す。

**【図 12】**

本発明の、同位体ピーク判定処理における、同位体ピーク強度分布算出及び最終同位体ピーク判定過程の概略図である。

**【図 13】**

本発明の、同位体ピーク判定処理の結果による、各ピークの  $m/z$ 、 $m$ 、 $z$  及び、包含同位体数の表示例である。

**【図 14】**

本発明の処理を、質量分析計測中の実時間内で実施する場合の実施タイミングの一例である。

**【図 15】**

本発明の第二実施例による質量分析フローの自動判定処理の概略図である。

**【図 16】**

本発明の第三実施例による質量分析フローの自動判定処理の概略図である。

**【図 17】**

本発明の第四実施例による質量分析フローの自動判定処理の概略図である。

**【図 18】**

質量数に応じた、同位体ピークの強度分布パターンを表す。

**【図 19】**

本発明の第五実施例における同位体判定処理内容の概略図である。

**【図 20】**

本発明の第六実施例における、タンデム質量分析の親イオン選択の概略図である。

**【図 21】**

本発明の第七実施例における、同一の  $m/z$  値を持つ複数イオン種の同位体パターン例である。

**【図 22】**

本発明の第八実施例における、同位体標識時の、次のタンデム質量分析ターゲット選定の概念図である。

**【図 23】**

本発明の第九実施例による質量分析フローの自動判定処理の概略図である。

**【図 24】**

本発明の第十実施例における、次のタンデム質量分析ターゲット選定の概念図である。

**【図 25】**

本発明の第十一実施例による、質量分析システム全体の概略図である。



## 【図 26】

本発明の第十二実施例による、質量分析システム全体の概略図である。

## 【図 27】

本発明の第十三実施例による、質量分析システム全体の概略図である。

## 【図 28】

本発明の第十四実施例による、質量分析システム全体の概略図である。

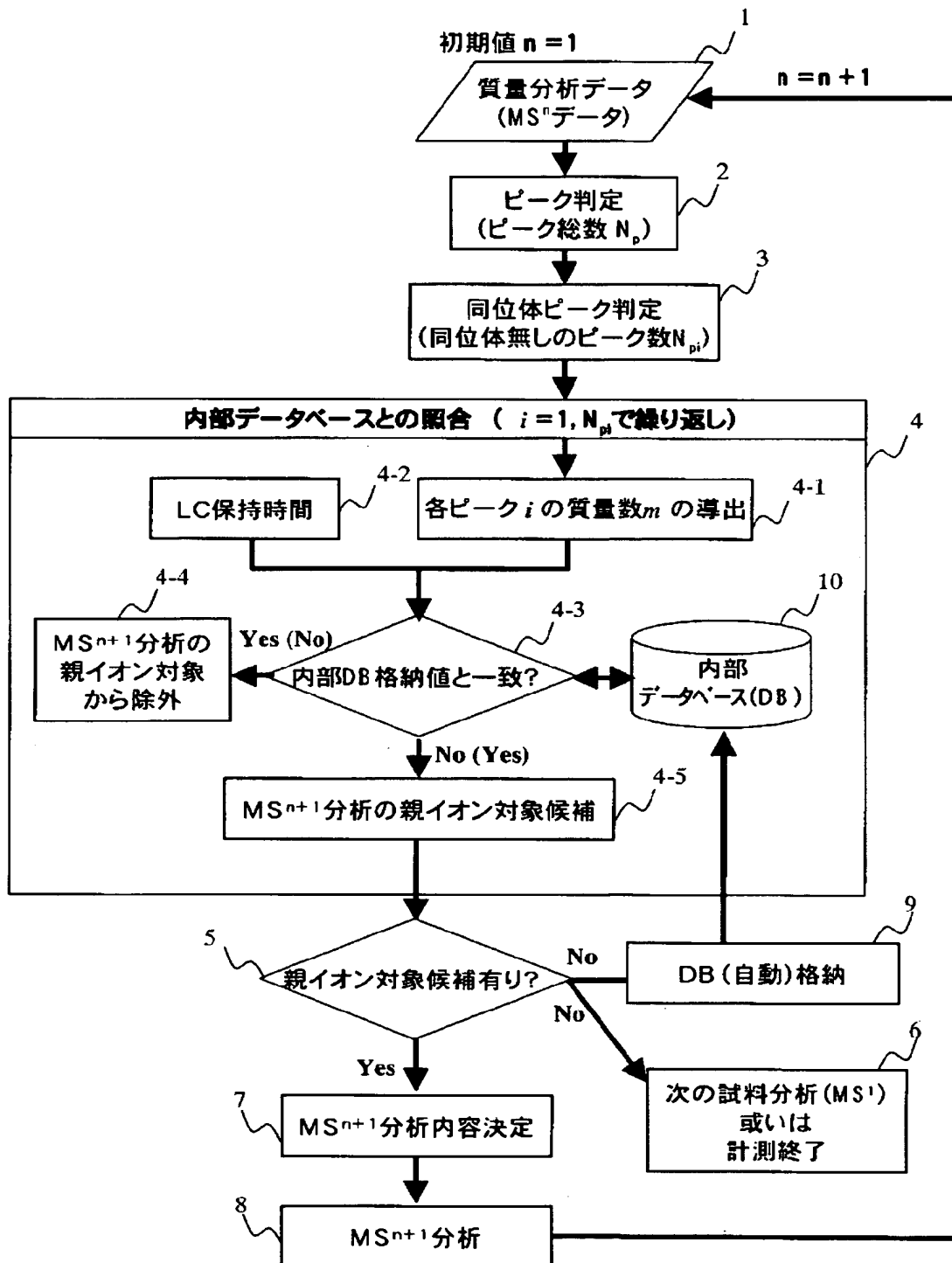
## 【符号の説明】

1…質量分析データ( $MS^n$ )、2…ピーク判定処理、3…同位体ピーク判定処理、4…内部データベースとの照合処理、5…親イオン対象候補の有無の判定、6…別の試料の $MS^1$ 分析、或いは、計測流量判定、7… $MS^{n+1}$ 分析内容決定処理、8… $MS^{n+1}$ 分析、9…結果の内部DB自動格納、10…内部データベース、11…前処理系、12…イオン化部、13…質量分析部、14…イオン検出部、15…データ処理部、16…表示部、17…制御部、18…ユーザ入力部、19…質量分析システム全体、20…イオントラップ型質量分析部、21…飛行時間型質量分析部、22…リニアトラップ、23…四重極(Qポール)、24…コリジョンセル、25…各ピーク強度、26…同位体ピーク強度パターンDB。

【書類名】 図面

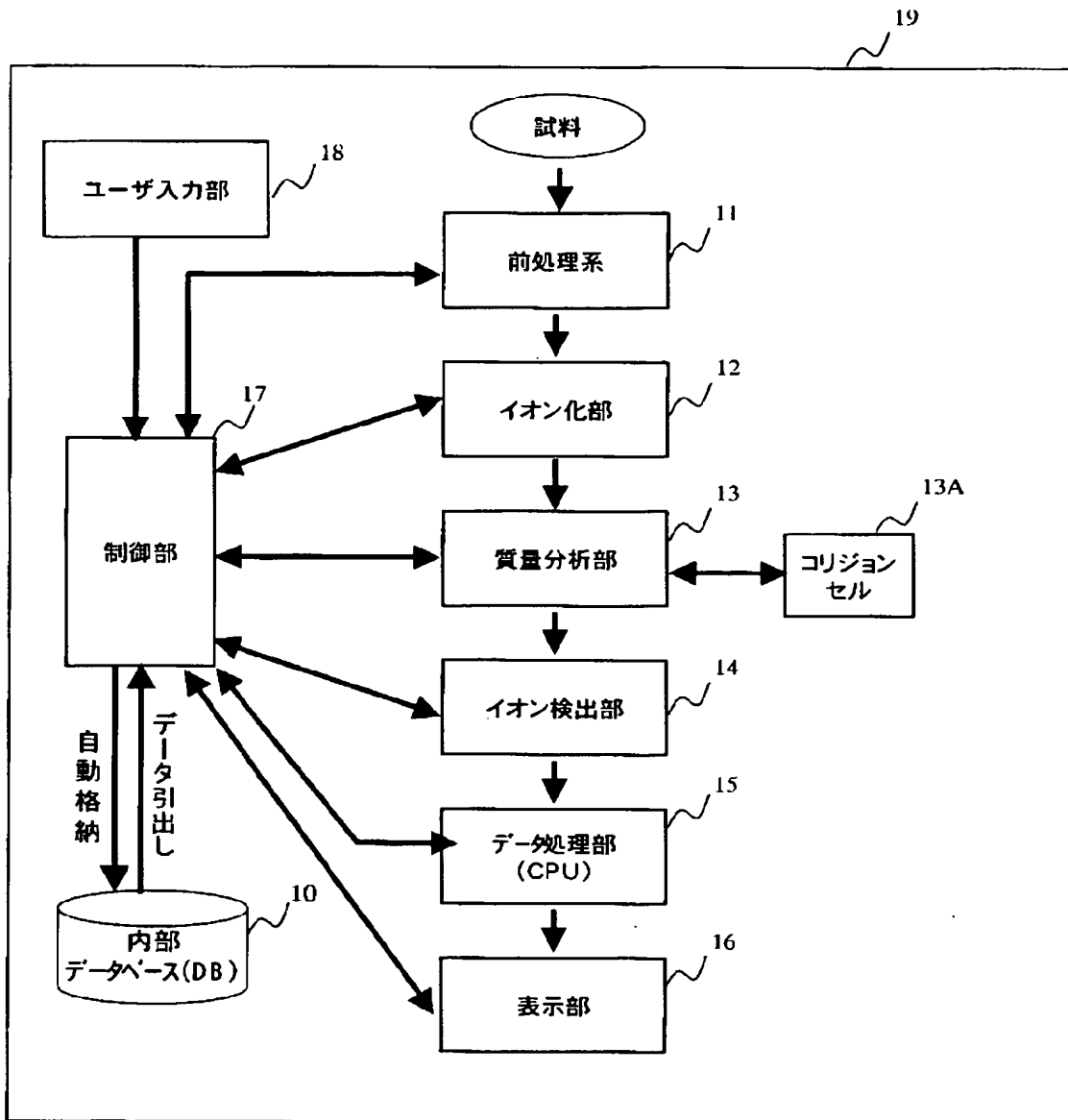
【図 1】

図 1



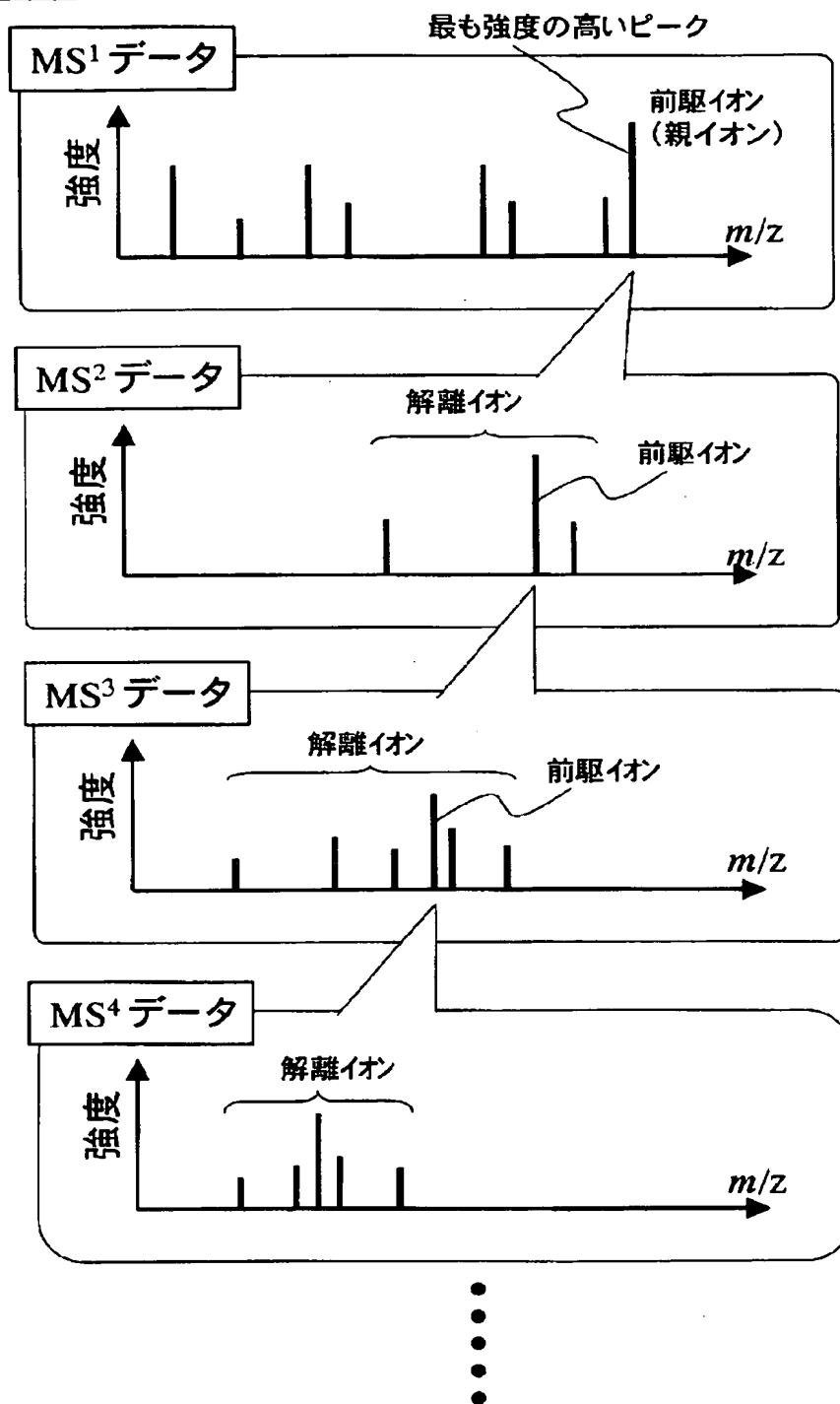
【図 2】

図 2



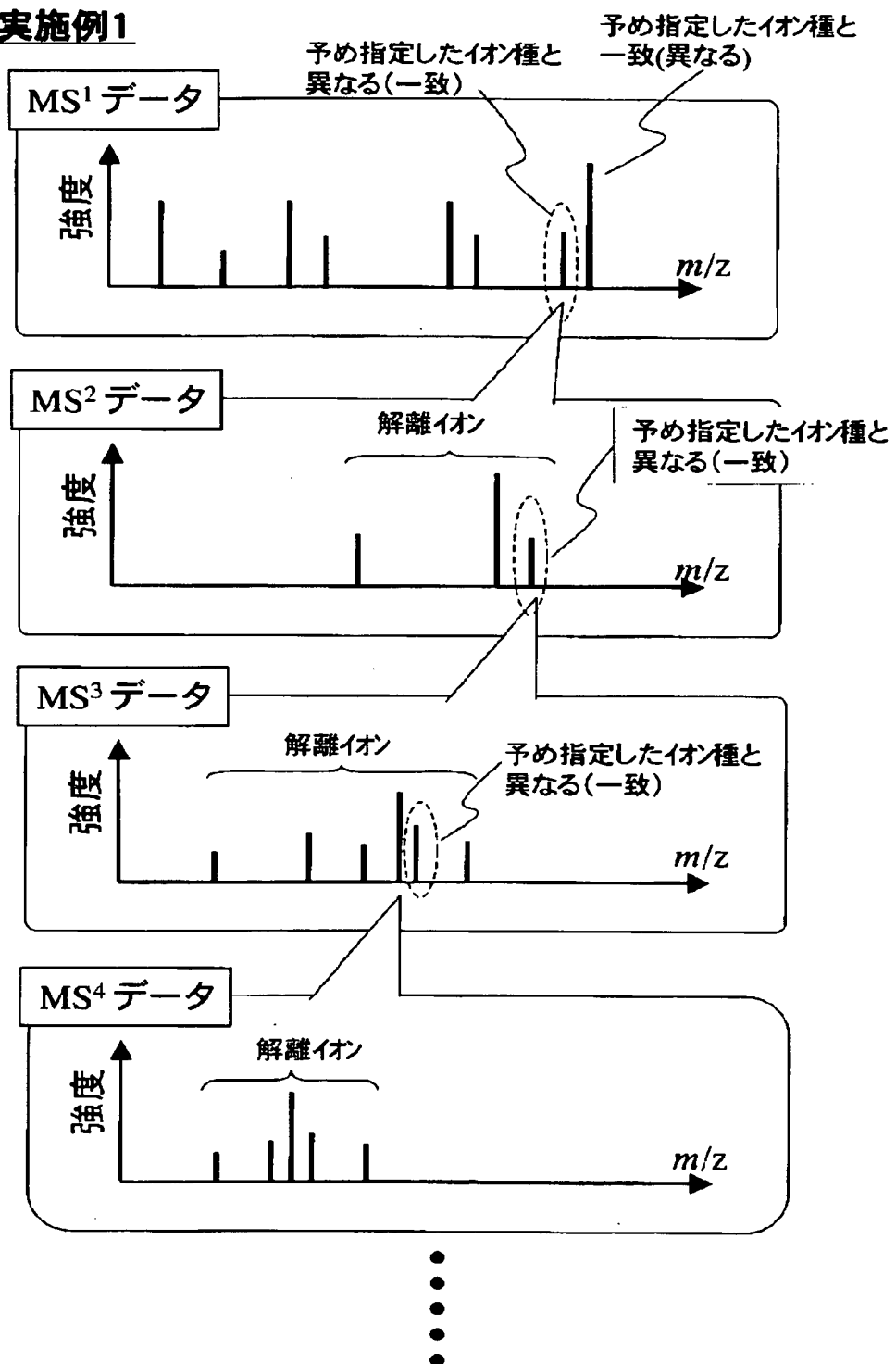
【図 3】

図 3

**従来法**

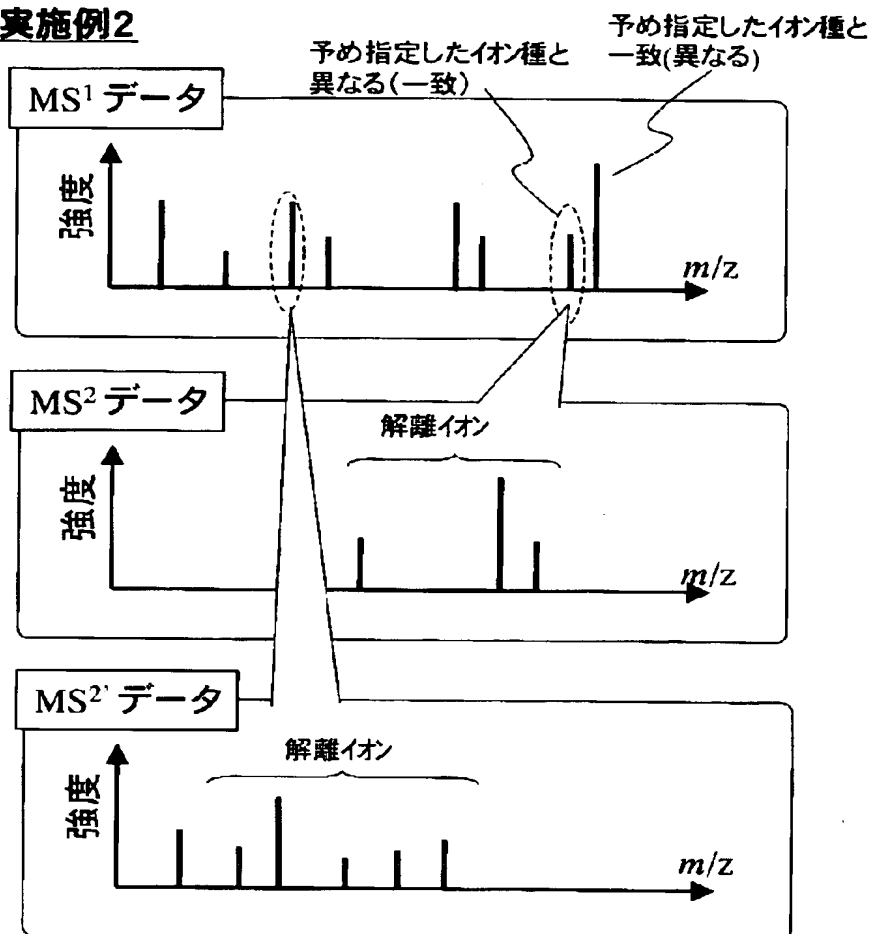
【図 4】

図 4

**本実施例1**

【図 5】

図 5

**本実施例2**

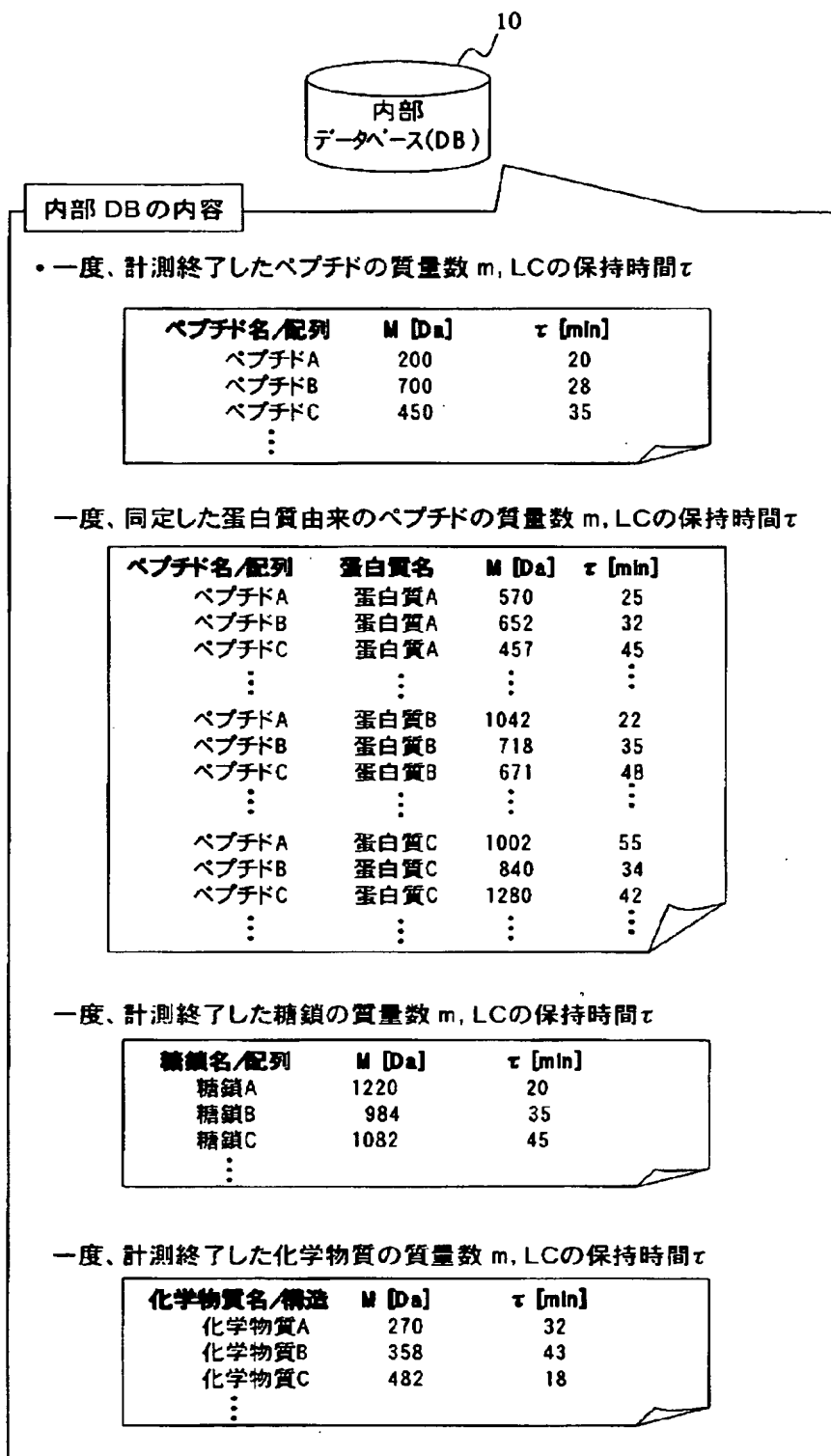
【図 6】

図 6



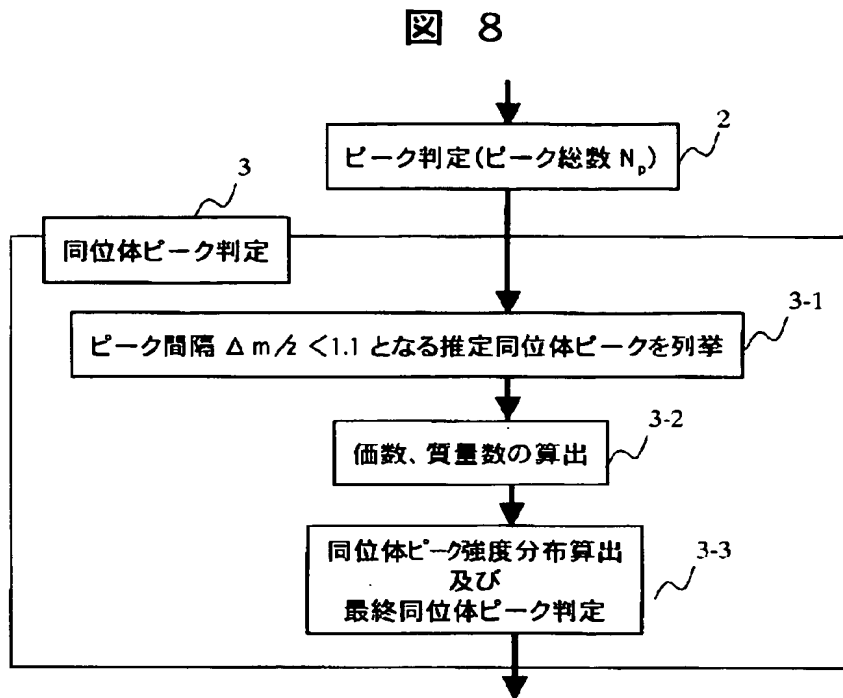
【図 7】

図 7





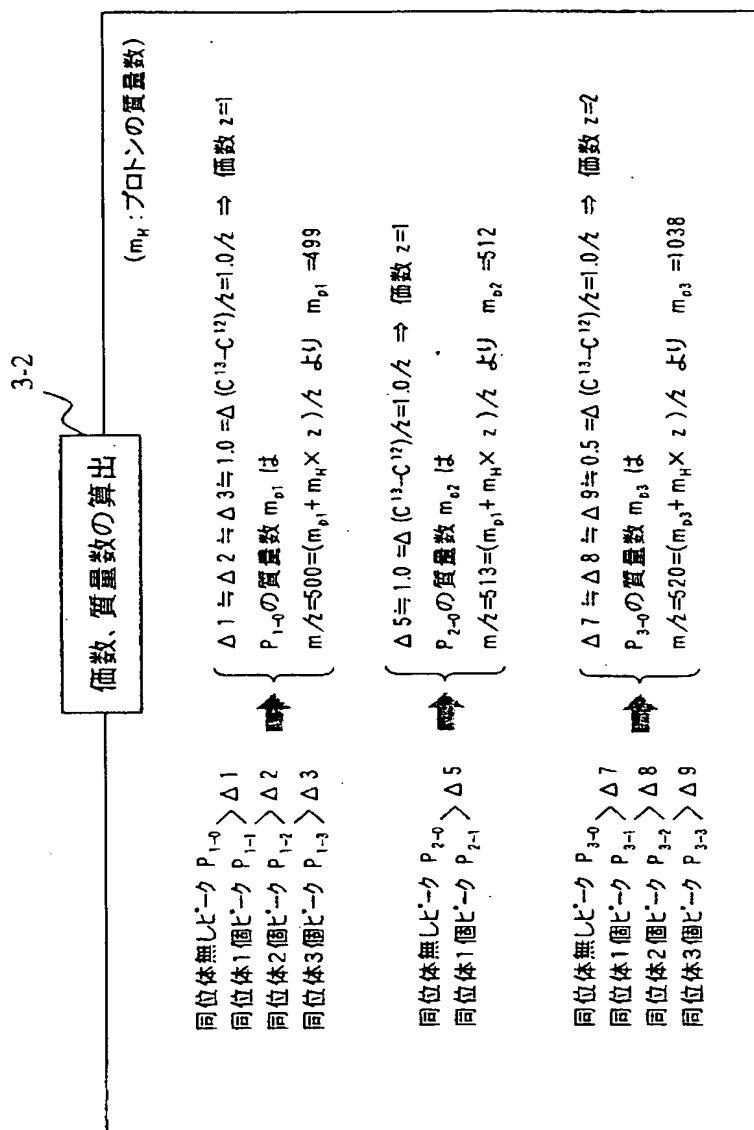
【図 8】





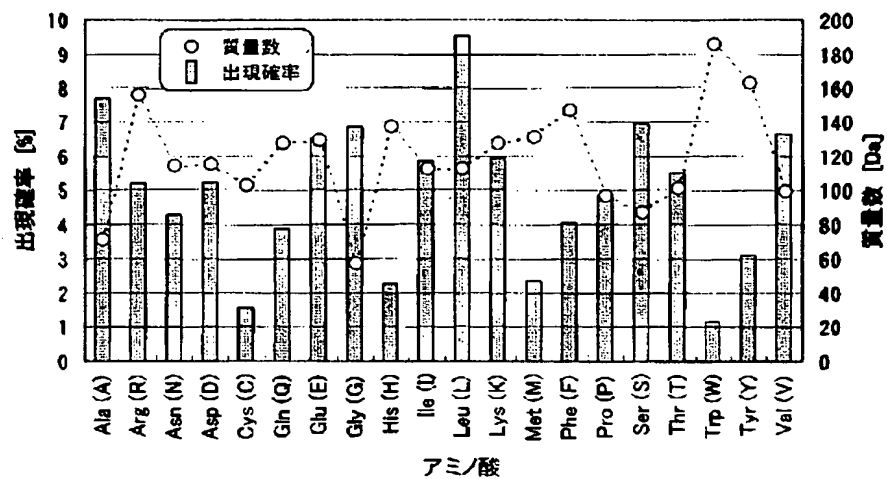
【図 10】

図 10



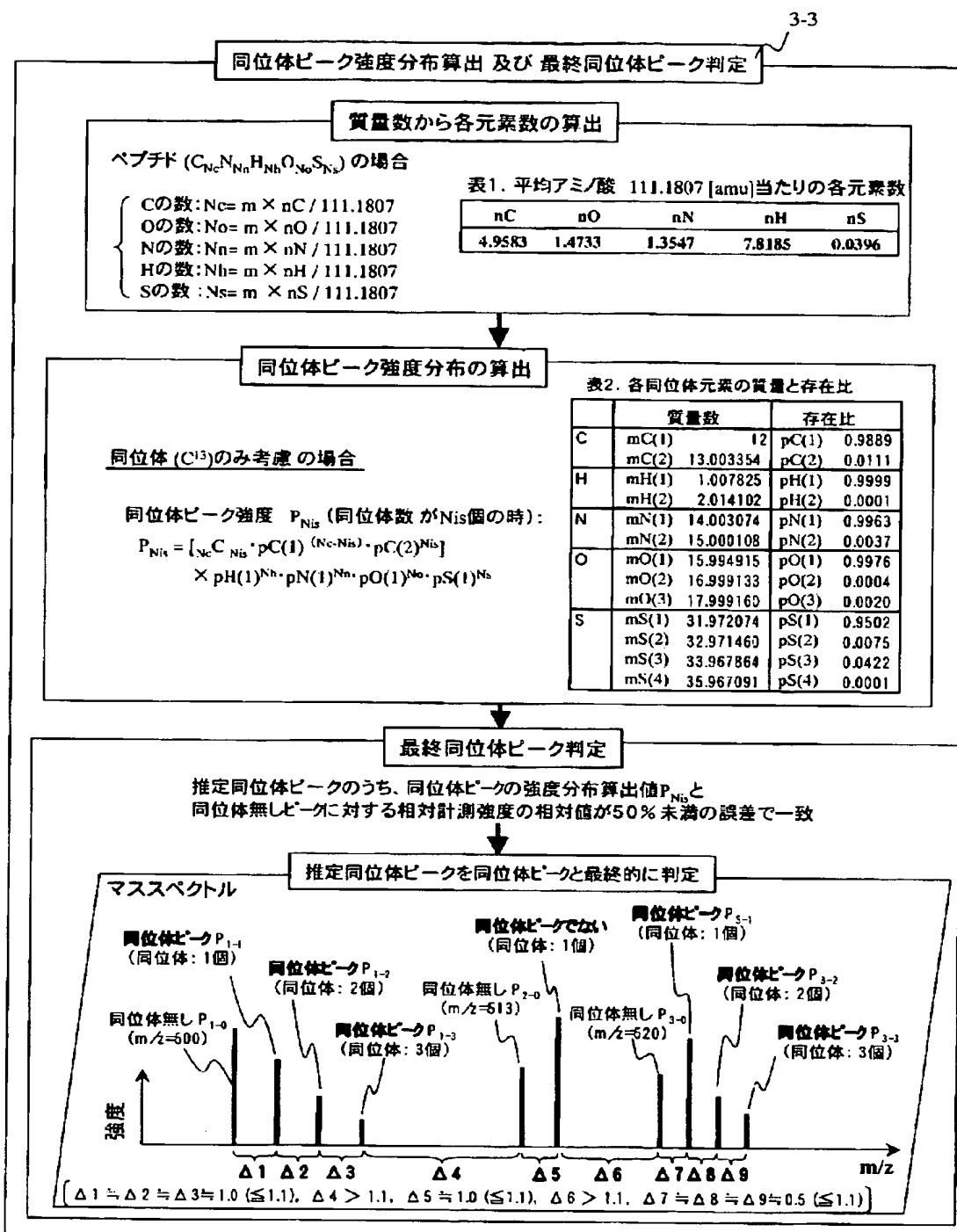
【図 11】

図 11



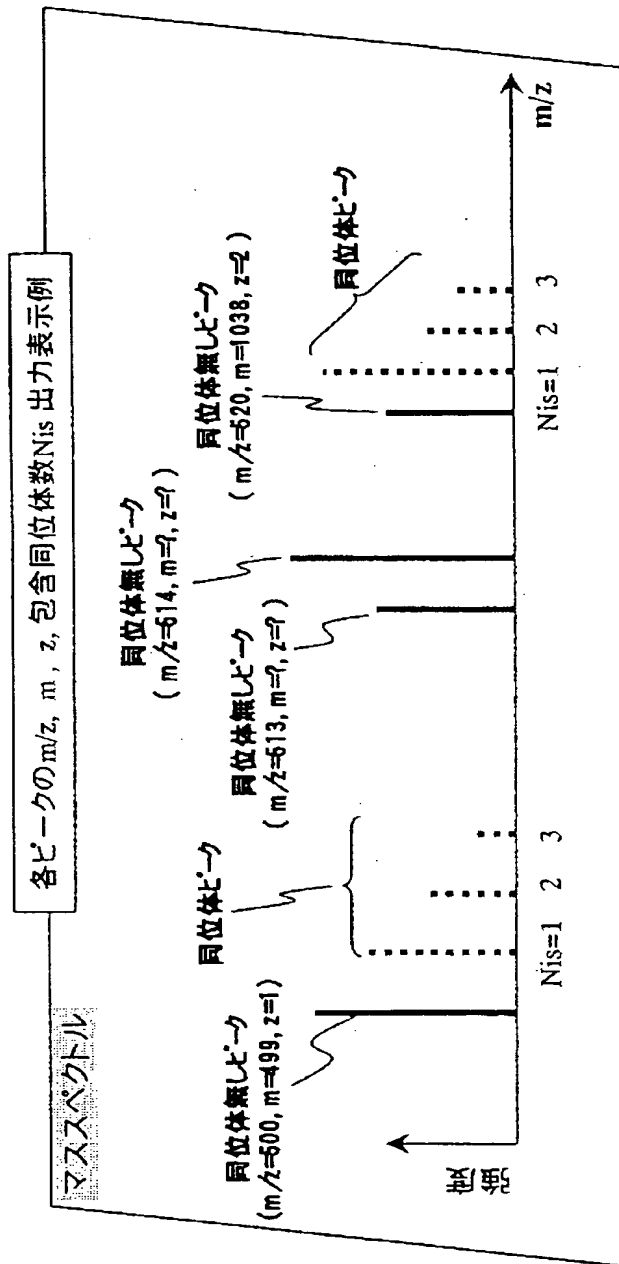
【図 12】

図 12



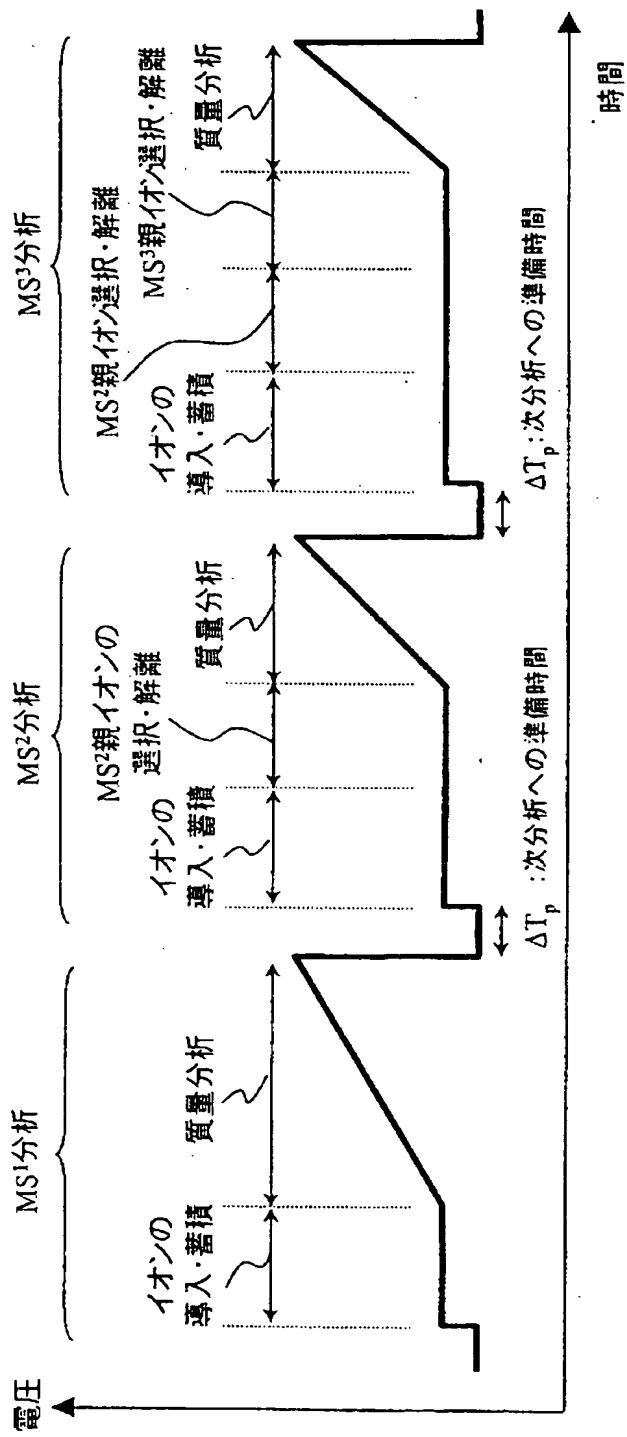
【図 13】

図 13



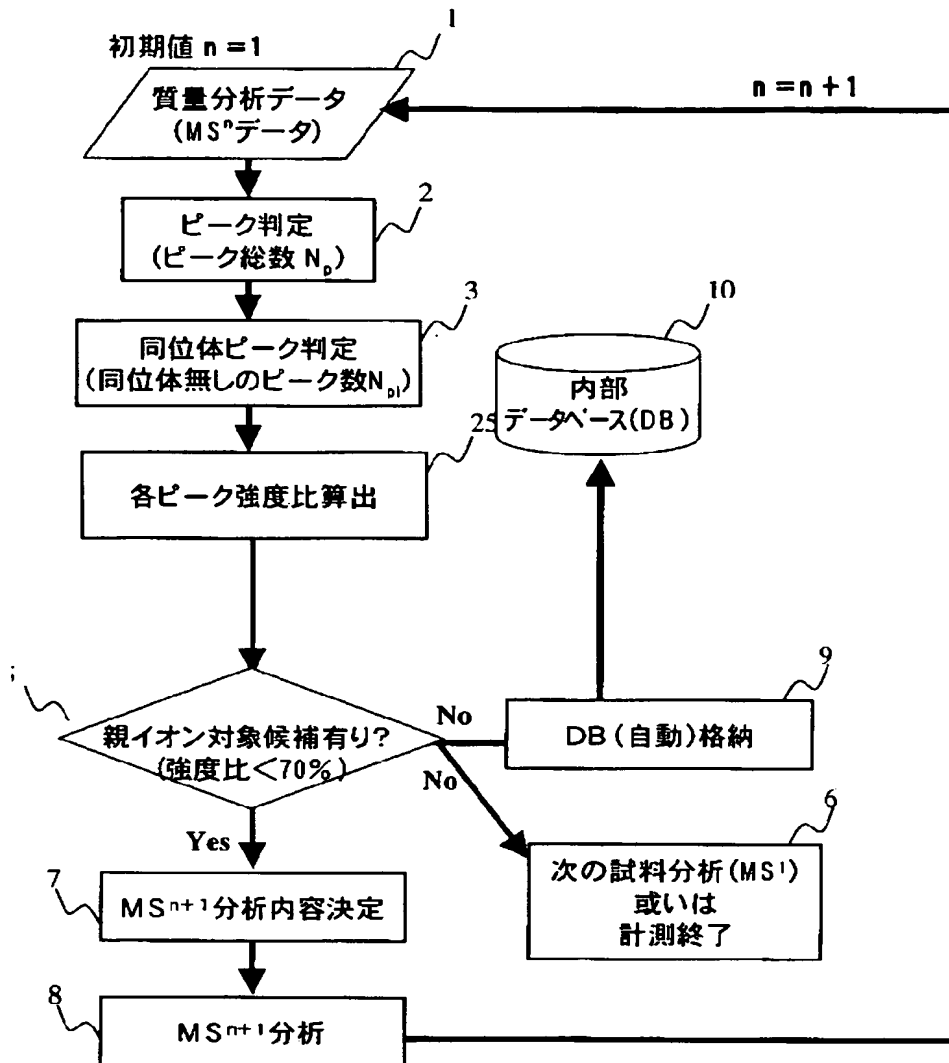
【図 14】

図 14



【図 15】

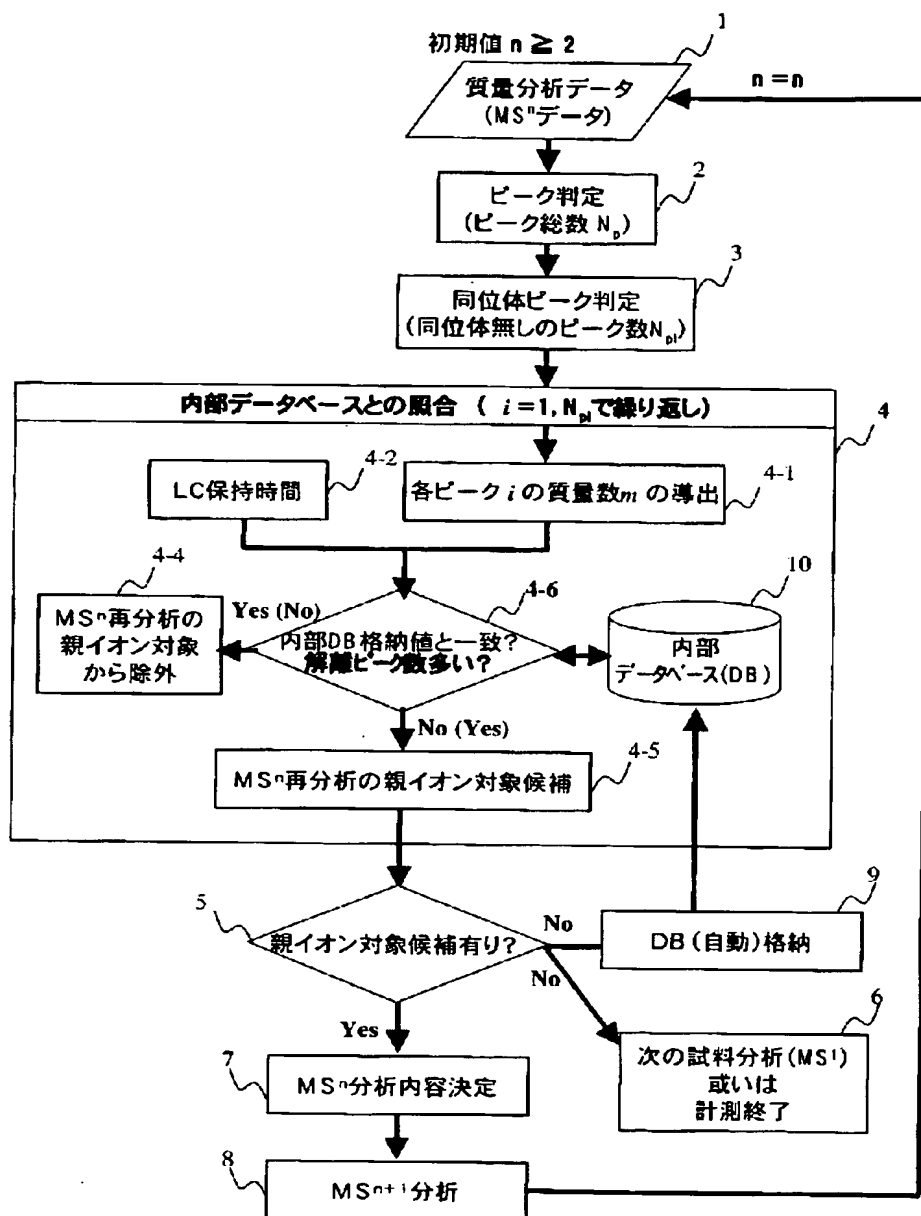
図 15





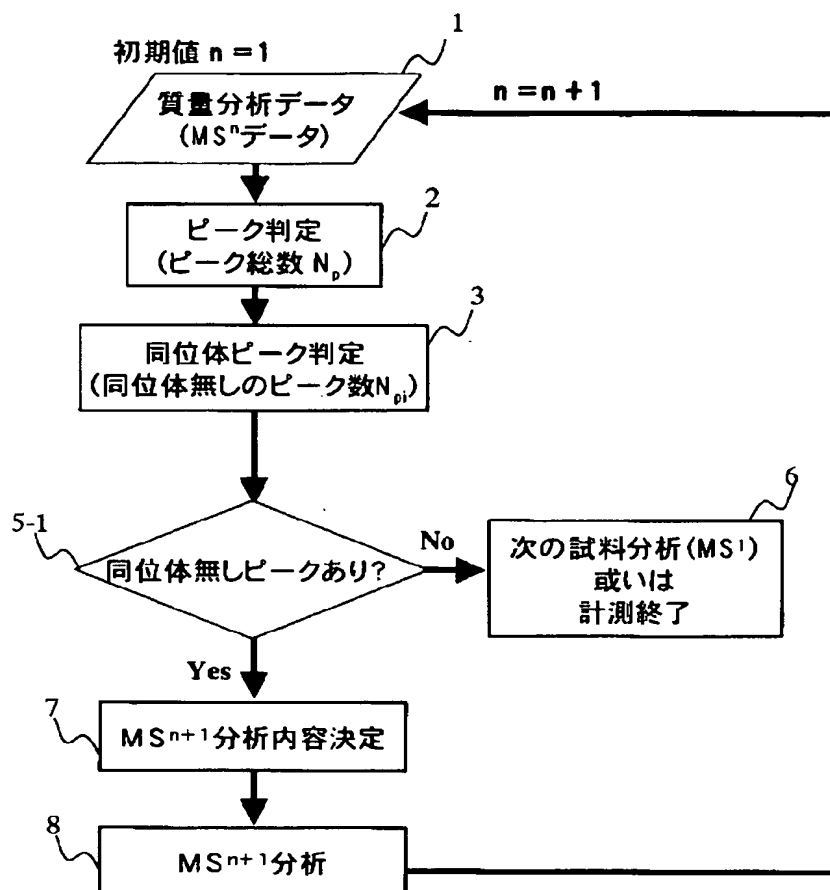
【図 16】

図 16



【図 17】

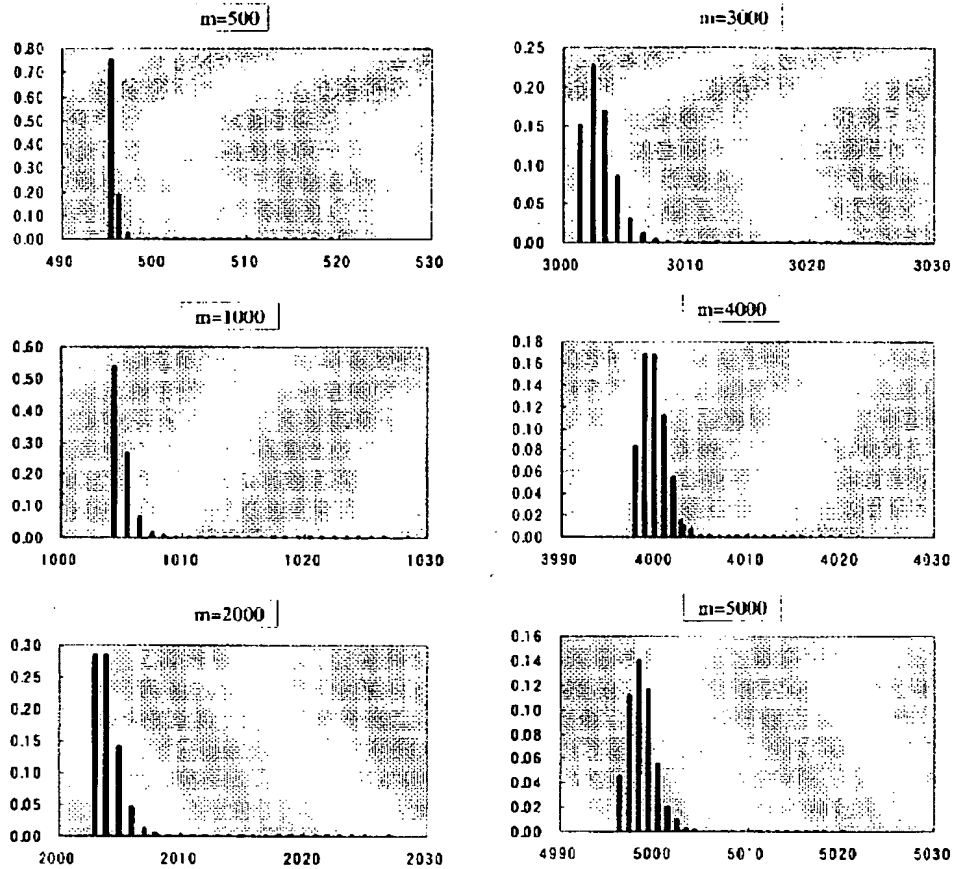
図 17



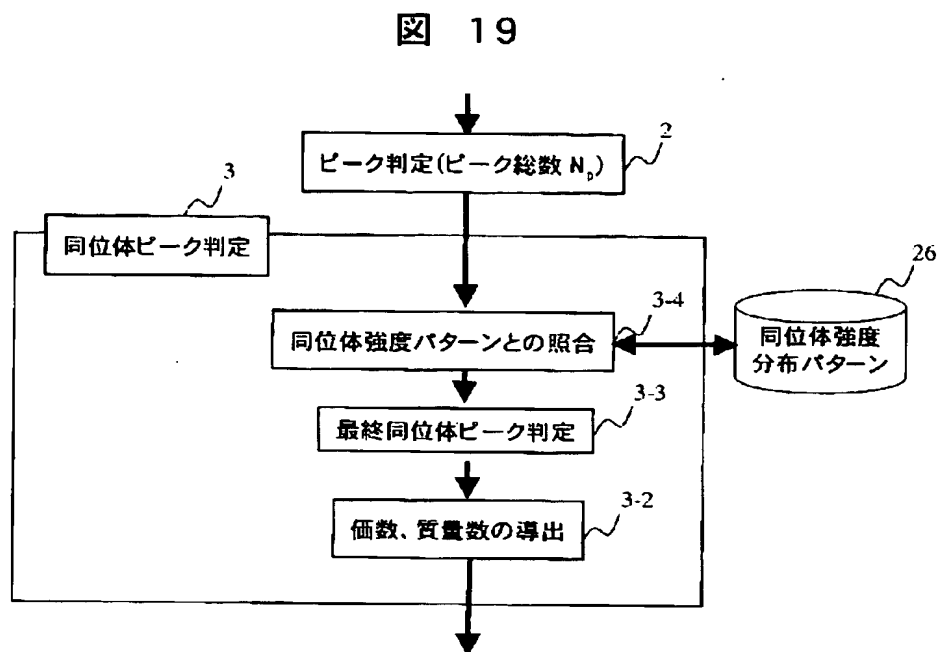
【図 18】

図 18

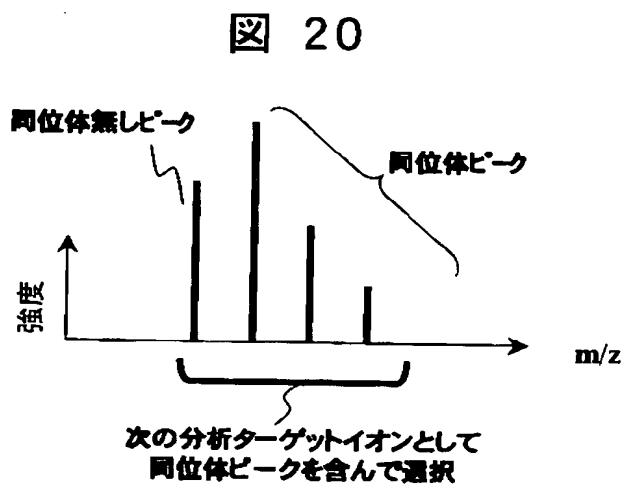
イオン質量数に応じた 同位体ピーク強度分布のパターン



【図 19】

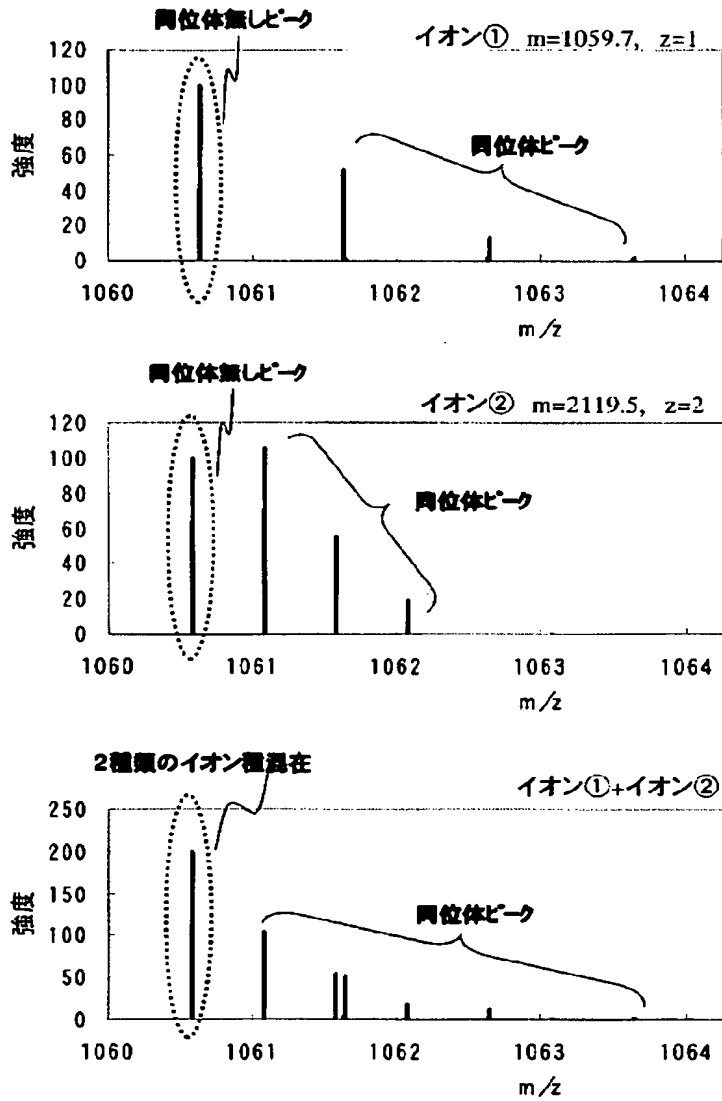


【図 20】



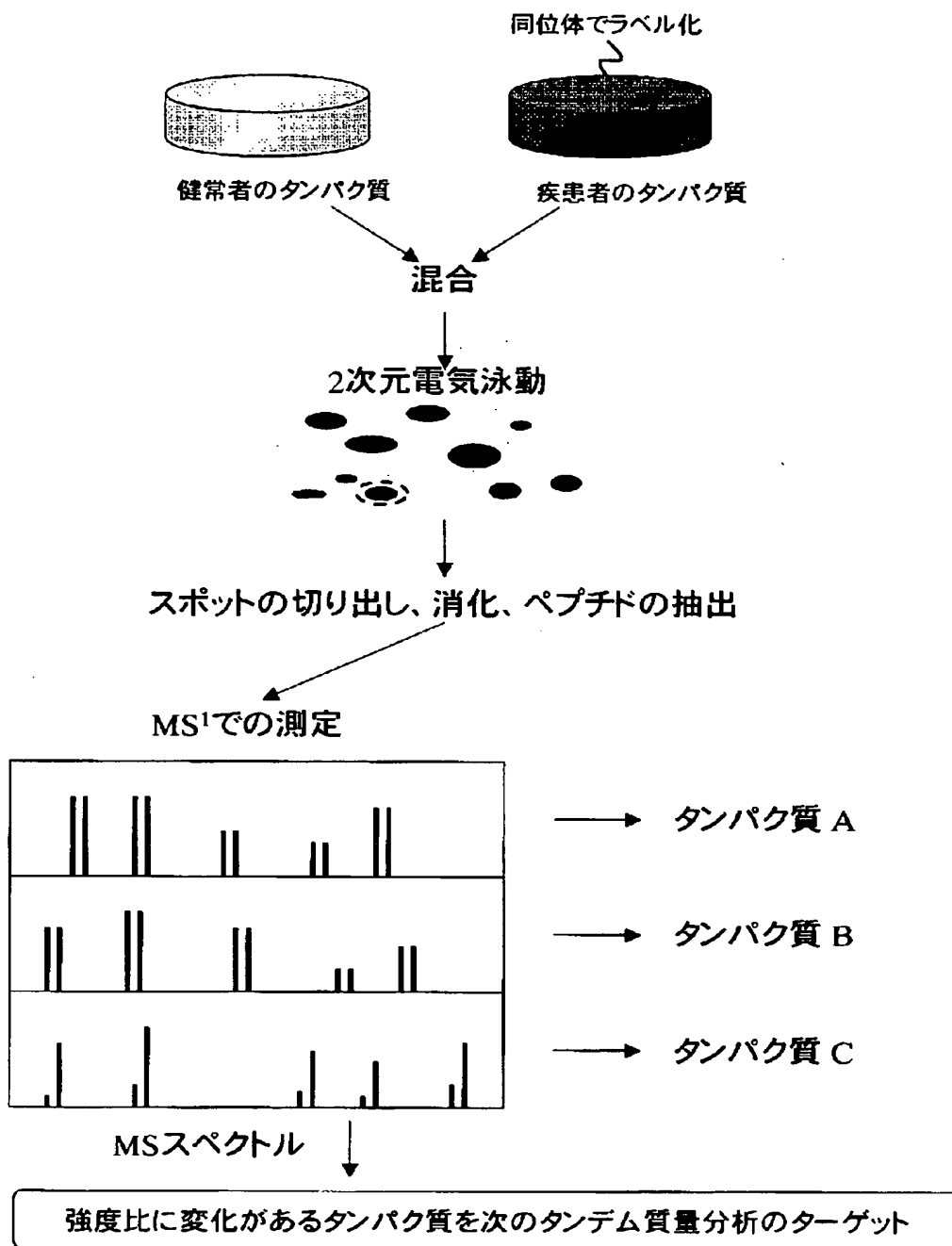
【図 21】

図 21



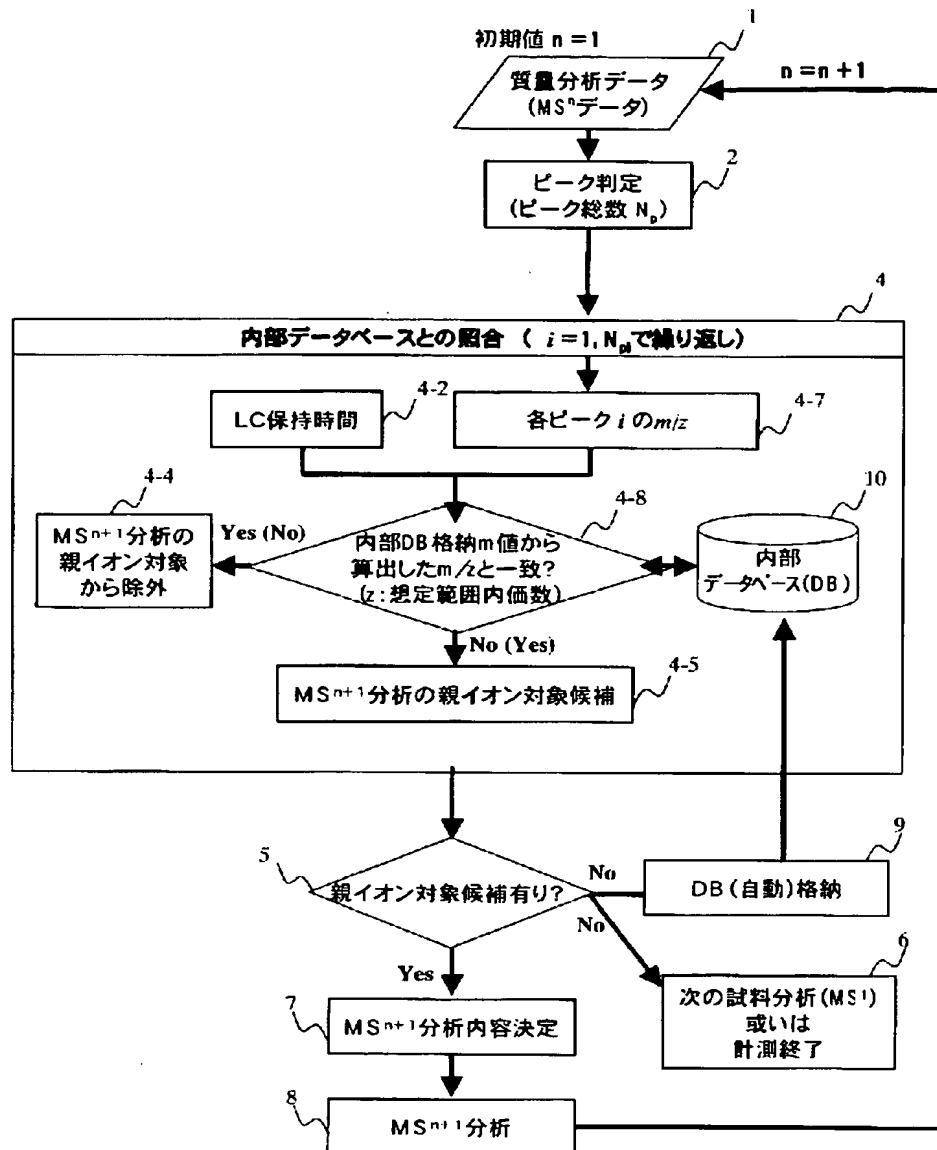
【図 22】

図 22



【図 23】

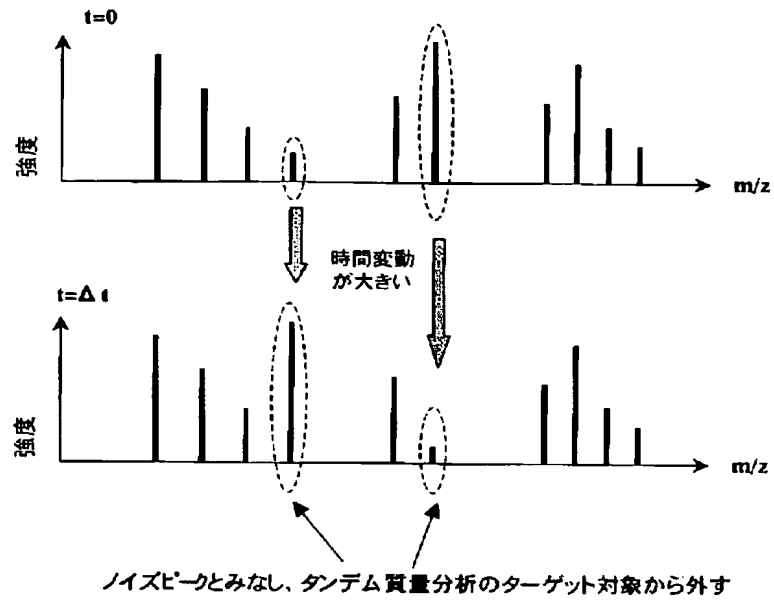
図 23



【図 24】

図 24

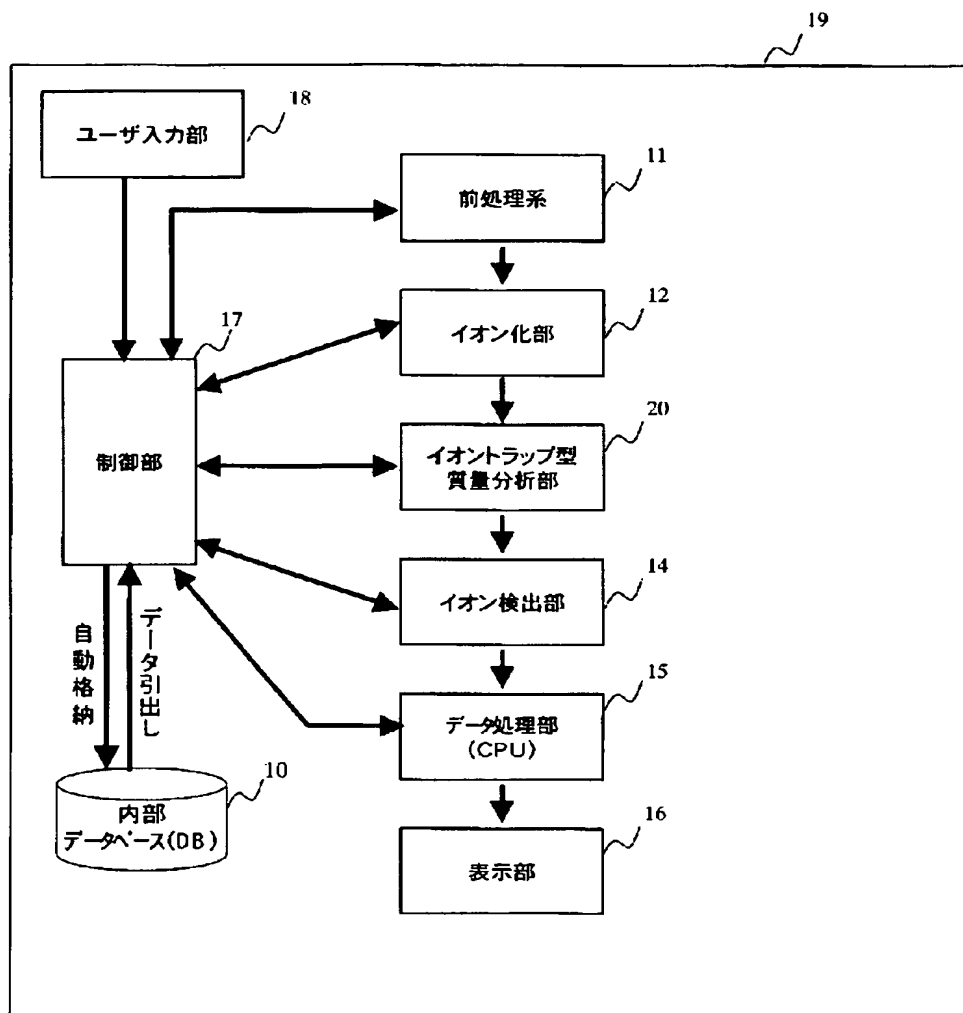
マススペクトル





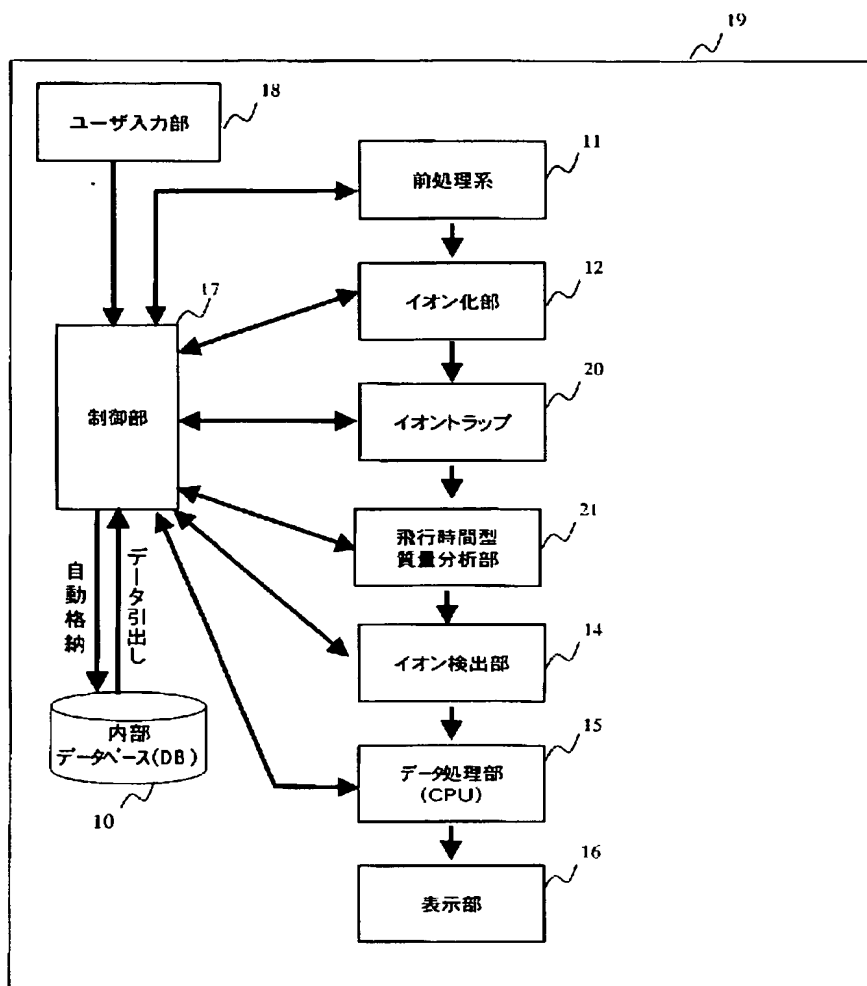
【図 25】

図 25



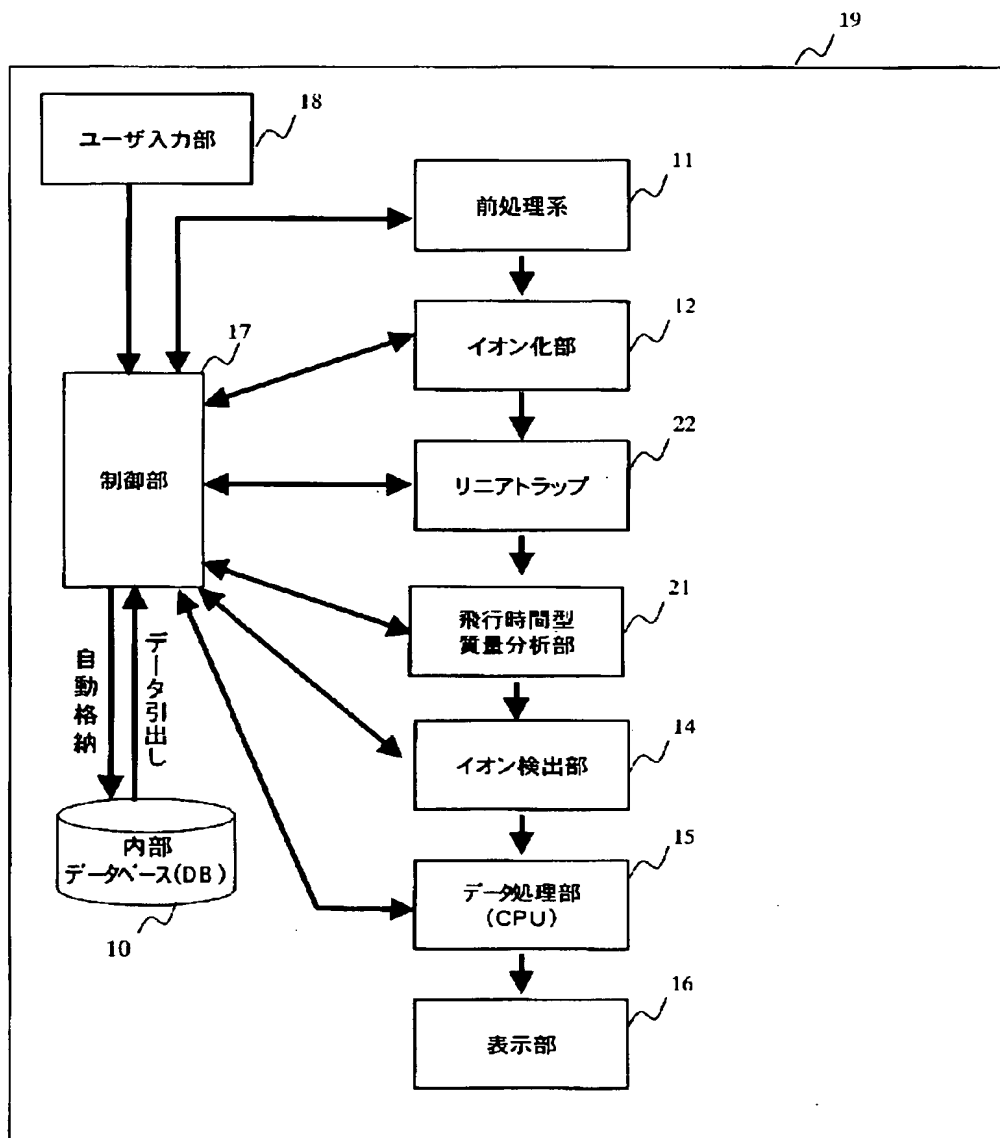
【図 26】

図 26



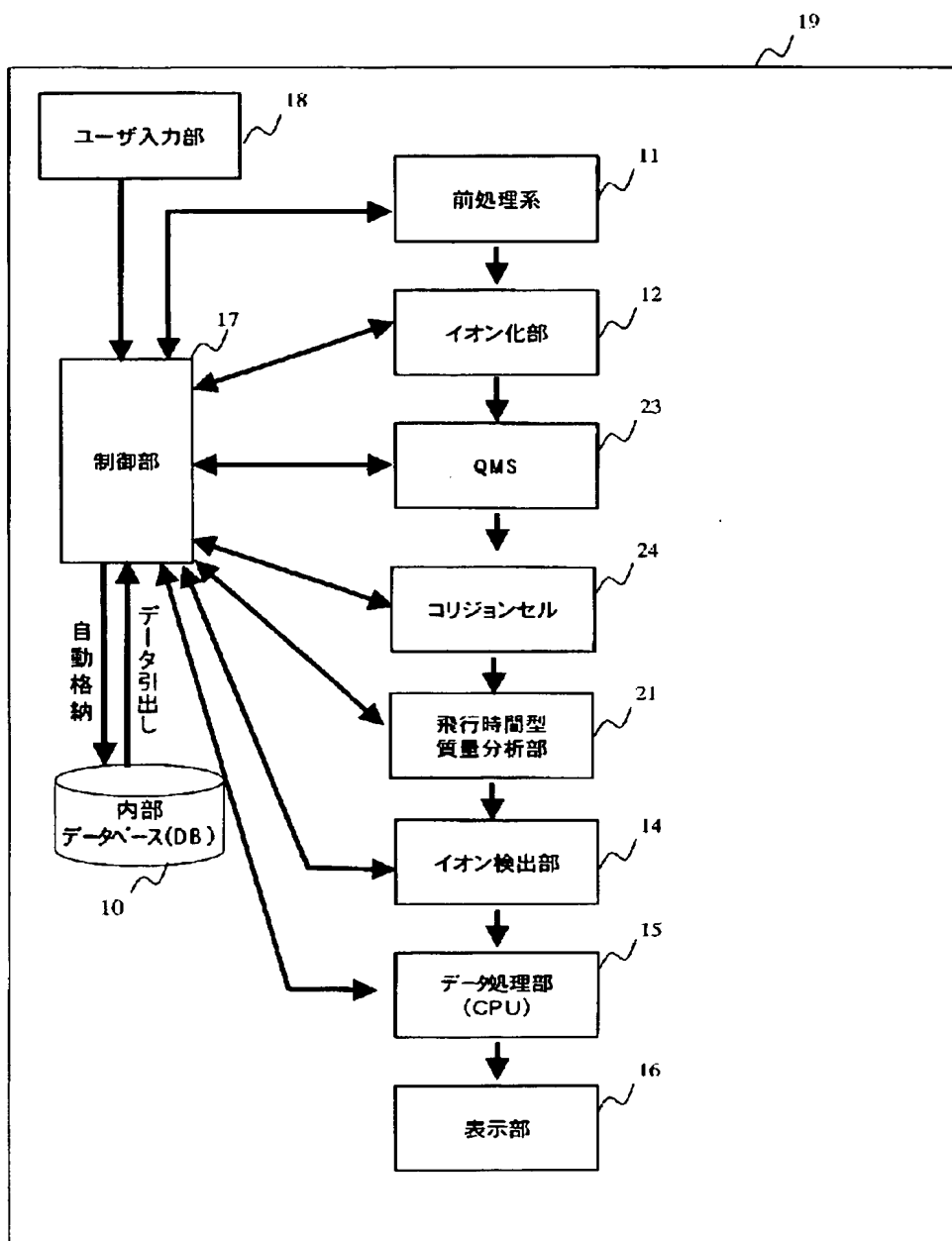
【図 27】

図 27



【図 28】

図 28



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明の目的は、タンパク質やペプチドをタンデム質量分析により、構造解析する際、既に計測済みの、多量に発現するタンパク質由来のペプチドイオンをタンデム質量分析ターゲットとして回避し、これまで分析が困難であった微量なタンパク質由来のペプチドなどをタンデム質量分析ターゲットとして自動的に、測定の実時間内に判定処理することである。

【解決手段】

本発明では、上記課題を、既に計測した蛋白質、及び、それに由来するペプチドデータを内部データベースに自動格納し、それらと計測データを高精度に照合、同位体ピーク判定することにより、未計測のペプチドピークを、次のタンデム分析ターゲットとして選定する処理を計測の実時間内に実施し、同じタンパク質由来のペプチドの重複計測を回避する。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-207425
受付番号	50301340770
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成15年 8月14日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 8月13日

特願 2 0 0 3 - 2 0 7 4 2 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 5 1 0 8 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 3 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区神田駿河台 4 丁目 6 番地
氏 名	株式会社日立製作所

特願 2 0 0 3 - 2 0 7 4 2 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 1 3 8 7 8 3 9 ]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 1 0 月 3 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 号

氏 名 株式会社日立ハイテクノロジーズ